

09/582337

PCT/JP98/05697

日 本 国 特 許 庁

20.01.99

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1998年12月15日

EAKV

出 願 番 号

Application Number:

平成10年特許願第356183号

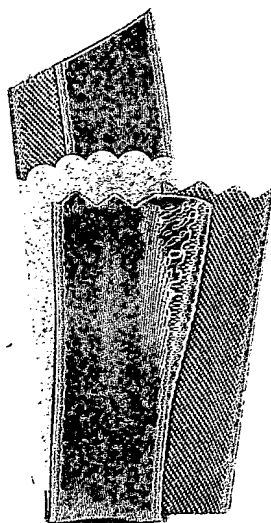
出 願 人

Applicant(s):

日本たばこ産業株式会社

REC'D 12 MAR 1999

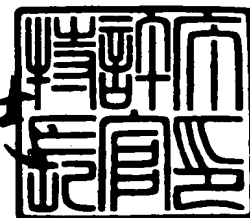
WIPO PCT

PRIORITY
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 2月26日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

山 佐 平 建 志



出証番号 出証特平11-3009560

【書類名】 特許願
 【整理番号】 J98-0215
 【あて先】 特許庁長官 殿
 【国際特許分類】 C07K 16/28

C07K 17/00
 A61K 39/395
 C12N 5/12
 C12P 21/08
 G01N 33/53
 G01N 33/577

【発明の名称】 結合組織増殖因子に対するモノクローナル抗体及びその
 医薬用途

【請求項の数】 82

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市金沢区福浦 1-13-2 日本たばこ産
 業株式会社 医薬探索研究所内

【氏名】 玉谷 卓也

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市金沢区福浦 1-13-2 日本たばこ産
 業株式会社 医薬探索研究所内

【氏名】 手塚 克成

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市金沢区福浦 1-13-2 日本たばこ産
 業株式会社 医薬探索研究所内

【氏名】 坂本 信二

【発明者】

【住所又は居所】 岡山県岡山市東山二丁目 17-22-304

【氏名】 滝川 正春

【特許出願人】

【識別番号】 000004569

【氏名又は名称】 日本たばこ産業株式会社

【代表者】 水野 勝

【代理人】

【識別番号】 100100217

【弁理士】

【氏名又は名称】 大東 輝雄

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成 9年特許願第367699号

【出願日】 平成 9年12月25日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 058632

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9803681

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 結合組織増殖因子に対するモノクローナル抗体及びその医薬用途

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の（a）乃至（g）のいずれかに記載の性質を有することを特徴とするモノクローナル抗体またはその一部：

（a）ヒト、マウス及びラットの結合組織増殖因子（CTGF）のいずれにも反応性を有する；

（b）ヒト及びマウスのCTGFのいずれにも反応性を有し、且つラットのCTGFに反応性を有しない；

（c）マウス及びラットのCTGFのいずれにも反応性を有し、且つヒトのCTGFに反応性を有しない；

（d）ヒト腎臓由来線維芽細胞株293-T（ATCC CRL-1573）とヒトのCTGFとの結合、または該細胞株293-TとマウスのCTGFとの結合を阻害する；

（e）ラット腎臓由来線維芽細胞株NRK-49F（ATCC CRL-1570）、ヒト骨肉腫由来細胞株MG-63（ATCC CRL-1427）またはヒト肺由来線維芽細胞のいずれかとヒトのCTGFとの結合を阻害する；

（f）ヒトのCTGFまたはマウスのCTGFの刺激によるラット腎臓由来線維芽NRK-49F（ATCC CRL-1570）の細胞増殖を阻害する；または

（g）ヒドロキシプロリンの生成が上昇的傾向を示している腎臓における該ヒドロキシプロリンの上昇を抑制する。

【請求項2】 モノクローナル抗体が、下記の（a）乃至（c）のいずれかに記載の性質を有することを特徴とする請求項1に記載のモノクローナル抗体またはその一部：

（a）ヒトのCTGFまたはその一部をマウスに免疫して得られるモノクローナル抗体またはその一部であって、ヒト、マウス及びラットのCTGFのいずれにも反応性を有する；

（b）マウスのCTGFまたはその一部をハムスターに免疫して得られるモノクローナル抗体またはその一部であって、ヒト、マウス及びラットのCTGFの

いずれにも反応性を有する；または

(c) マウスのCTGFまたはその一部をラットに免疫して得られるモノクローナル抗体またはその一部であって、ヒト、マウス及びラットのCTGFのいずれにも反応性を有する。

【請求項3】 モノクローナル抗体が、下記の(a)乃至(c)のいずれかに記載の性質を有することを特徴とする請求項1に記載のモノクローナル抗体またはその一部：

(a) ヒトのCTGFまたはその一部をマウスに免疫して得られるモノクローナル抗体であって、ヒト、マウス及びラットのCTGFのいずれにも反応性を有し、且つヒト腎臓由来線維芽細胞株293-T (ATCC CRL-1573) とヒトのCTGFとの結合を阻害する；

(b) マウスのCTGFまたはその一部をラットに免疫して得られるモノクローナル抗体であって、ヒト、マウス及びラットのCTGFのいずれにも反応性を有し、且つヒト腎臓由来線維芽細胞株293-T (ATCC CRL-1573) とマウスのCTGFとの結合を阻害する；または

(c) マウスのCTGFまたはその一部をハムスターに免疫して得られるモノクローナル抗体であって、ヒト、マウス及びラットのCTGFのいずれにも反応性を有し、且つヒト腎臓由来線維芽細胞株293-T (ATCC CRL-1573) とマウスのCTGFとの結合を阻害する

【請求項4】 該モノクローナル抗体が、国際寄託番号FERM BP-6208で識別される融合細胞から産生されるモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項1に記載のモノクローナル抗体またはその一部。

【請求項5】 該モノクローナル抗体が、国際寄託番号FERM BP-6208で識別される融合細胞から産生されるモノクローナル抗体と実質的に同一の性質を有するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項1に記載のモノクローナル抗体またはその一部。

【請求項6】 該モノクローナル抗体が、国際寄託番号FERM BP-6209で識別される融合細胞から産生されるモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項1に記載のモノクローナル抗体またはその一部。

【請求項 7】 該モノクローナル抗体が、国際寄託番号 FERM BP-6209 で識別される融合細胞から産生されるモノクローナル抗体と実質的に同一の性質を有するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはその一部。

【請求項 8】 ヒト、マウス、またはラットの CTGF のいずれかに反応性を有するヒトモノクローナル抗体またはその一部。

【請求項 9】 ヒトモノクローナル抗体が、ヒトの CTGF に反応性を有するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 8 に記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。

【請求項 10】 下記の (a) 乃至 (d) のいずれかに記載の性質を有するヒトの CTGF に反応性を有するヒトモノクローナル抗体またはその一部：

(a) ヒト腎臓由来線維芽細胞株 293-T (ATCC CRL-1573) とヒトの CTGF との結合を阻害する；

(b) ラット腎臓由来線維芽細胞株 NRK-49F (ATCC CRL-1570)、ヒト骨肉腫由来細胞株 MG-63 (ATCC CRL-1427) またはヒト肺由来線維芽細胞のいずれかとヒトの CTGF との結合を阻害する；

(c) ヒトの CTGF またはマウスの CTGF の刺激によるラット腎臓由来線維芽 NRK-49F (ATCC CRL-1570) の細胞増殖を阻害する；または

(d) ヒドロキシプロリンの生成が上昇的傾向を示している腎臓における該ヒドロキシプロリンの上昇を抑制する。

【請求項 11】 ヒトモノクローナル抗体が、ヒト抗体を産生する能力を有するトランスジェニック非ヒト哺乳動物に由来するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 8 乃至請求項 10 のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。

【請求項 12】 ヒトモノクローナル抗体が、ヒトの CTGF を、ヒト抗体を産生する能力を有するトランスジェニック非ヒト哺乳動物に免疫することにより得られるモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 11 に記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。

【請求項 13】 トランスジェニック非ヒト哺乳動物が、トランスジェニッ

クマウスであることを特徴とする請求項 8 乃至請求項 12 のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。

【請求項 14】 該ヒトモノクローナル抗体の重鎖可変領域をコードする V 領域の DNA が、DP-5、DP-38、DP-65 及び DP-75 からなる群から選ばれるいずれかの遺伝子セグメントに由来することを特徴とする請求項 8 乃至請求項 13 のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。

【請求項 15】 該ヒトモノクローナル抗体の軽鎖可変領域をコードする V 領域の DNA が、DPK1、DPK9、DPK12 及び DPK24 からなる群から選ばれるいずれかの遺伝子セグメントに由来することを特徴とする請求項 8 乃至請求項 13 のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。

【請求項 16】 該ヒトモノクローナル抗体の重鎖可変領域をコードする V 領域の DNA が、DP-5、DP-38、DP-65 及び DP-75 からなる群から選ばれるいずれかの遺伝子セグメントに由来し、且つ該ヒトモノクローナル抗体の軽鎖可変領域をコードする V 領域の DNA が、DPK1、DPK9、DPK12 及び DPK24 からなる群から選ばれるいずれかの遺伝子セグメントに由来することを特徴とする請求項 8 乃至請求項 15 のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。

【請求項 17】 該ヒトモノクローナルの重鎖可変領域が、下記 (a) 乃至 (j) のいずれかのアミノ酸配列を含むアミノ酸を有することを特徴とする請求項 9 に記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部：

(a) 配列番号 6 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 120 番目のアミノ酸配列；

(b) 配列番号 6 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 120 番目のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列；

(c) 配列番号 8 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 118 番目のアミノ酸配列；

(d) 配列番号 8 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 118 番目のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列；

(e) 配列番号 10 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 116 番目のアミノ酸配列；

(f) 配列番号 10 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 116 番目のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列；

(g) 配列番号 12 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 116 番目のアミノ酸配列；

(h) 配列番号 12 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 116 番目のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列；

(i) 配列番号 14 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 117 番目のアミノ酸配列；または

(j) 配列番号 14 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 117 番目のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列。

【請求項 18】 該ヒトモノクローナルの軽鎖可変領域が、下記 (a) 乃至 (j) のいずれかのアミノ酸配列を含むアミノ酸を有することを特徴とする請求項 9 に記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部：

(a) 配列番号 16 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 120 番目のアミノ酸配列；

(b) 配列番号 16 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 120 番目のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列；

(c) 配列番号 18 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 121 番目のアミノ酸配列；

(d) 配列番号 18 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 121 番目のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列；

(e) 配列番号 20 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 23 乃至 117

番目のアミノ酸配列；

(f) 配列番号 20 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 23 乃至 117 番目のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列；

(g) 配列番号 22 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 17 乃至 111 番目のアミノ酸配列；

(h) 配列番号 22 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 17 乃至 111 番目のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列；

(i) 配列番号 24 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 23 乃至 118 番目のアミノ酸配列；または

(j) 配列番号 24 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 23 乃至 118 番目のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列。

【請求項 19】 ヒトの CTGF に反応性を有するモノクローナル抗体であって、国際寄託番号 FERM BP-6535 で識別される融合細胞から産生されるモノクローナル抗体またはその一部。

【請求項 20】 ヒトの CTGF に反応性を有するモノクローナル抗体であって、国際寄託番号 FERM BP-6535 で識別される融合細胞から産生されるモノクローナル抗体と実質的に同一の性質を有するモノクローナル抗体またはその一部。

【請求項 21】 ヒトの CTGF に反応性を有するモノクローナル抗体であって、国際寄託番号 FERM BP-6598 で識別される融合細胞から産生されるモノクローナル抗体またはその一部。

【請求項 22】 ヒトの CTGF に反応性を有するモノクローナル抗体であって、国際寄託番号 FERM BP-6598 で識別される融合細胞から産生されるモノクローナル抗体と実質的に同一の性質を有するモノクローナル抗体またはその一部。

【請求項 23】 ヒトの CTGF に反応性を有するモノクローナル抗体であって、国際寄託番号 FERM BP-6599 で識別される融合細胞から産生されるモノクローナル抗体またはその一部。

【請求項 24】 ヒトの CTGF に反応性を有するモノクローナル抗体であって、国際寄託番号 FERM BP-6599 で識別される融合細胞から産生されるモノクローナル抗体と実質的に同一の性質を有するモノクローナル抗体またはその一部。

【請求項 25】 ヒトの CTGF に反応性を有するモノクローナル抗体であって、国際寄託番号 FERM BP-6600 で識別される融合細胞から産生されるモノクローナル抗体またはその一部。

【請求項 26】 ヒトの CTGF に反応性を有するモノクローナル抗体であって、国際寄託番号 FERM BP-6600 で識別される融合細胞から産生されるモノクローナル抗体と実質的に同一の性質を有するモノクローナル抗体またはその一部。

【請求項 27】 ヒトの CTGF に反応性を有するモノクローナル抗体またはその一部であって、該モノクローナル抗体が、該モノクローナル抗体をヒトの CTGF に反応性を有する請求項 17 若しくは請求項 18 に記載のいずれかのモノクローナル抗体とヒトの CTGF からなる抗原抗体複合体に反応させた時、該抗原抗体複合体に反応性を有しないことを特徴とするモノクローナル抗体またはその一部。

【請求項 28】 該モノクローナル抗体が、ヒトモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 27 に記載のモノクローナル抗体またはその一部。

【請求項 29】 ラットの CTGF に反応性を有するモノクローナル抗体またはその一部。

【請求項 30】 可変領域が請求項 2 乃至請求項 7、請求項 27 または請求項 29 のいずれかに記載のモノクローナル抗体由来の可変領域であり、かつ定常領域がヒトイムノグロブリン由来の定常領域であることを特徴とするヒトの CTGF に反応性を有する組換えキメラモノクローナル抗体。

【請求項 31】 超可変領域の相補性決定領域の一部または全部が請求項 2 乃至請求項 7、請求項 27 または請求項 29 のいずれかに記載のモノクローナル抗体由来の相補性決定領域であり、超可変領域の枠組領域がヒトイムノグロブリン由来の枠組領域であり、かつ定常領域がヒトイムノグロブリン由来の定常領域であることを特徴とするヒトの CTGF に反応性を有する組換えヒト型モノクローナル抗体。

【請求項 32】 請求項 1 乃至請求項 29 のいずれかに記載のモノクローナル抗体を産生する細胞。

【請求項 33】 請求項 30 または請求項 31 に記載の組換えモノクローナル抗体を産生する細胞。

【請求項 34】 該細胞が、該モノクローナル抗体を産生する能力を哺乳動物由来の B 細胞と哺乳動物由来のミエローマ細胞とを融合して得られる融合細胞であることを特徴とする請求項 32 に記載の細胞。

【請求項 35】 該細胞が、該モノクローナル抗体の重鎖をコードする DNA 若しくはその軽鎖をコードする DNA のいずれか一方の DNA、または両方の DNA が細胞内に導入されることにより形質転換された遺伝子組換え細胞であることを特徴とする請求項 32 または請求項 33 に記載の細胞。

【請求項 36】 該融合細胞が、国際寄託番号 FERM BP-6535 で識別される融合細胞であることを特徴とする請求項 34 に記載の融合細胞。

【請求項 37】 該融合細胞が、国際寄託番号 FERM BP-6598 で識別される融合細胞であることを特徴とする請求項 34 に記載の融合細胞。

【請求項 38】 該融合細胞が、国際寄託番号 FERM BP-6599 で識別される融合細胞であることを特徴とする請求項 34 に記載の融合細胞。

【請求項 39】 該融合細胞が、国際寄託番号 FERM BP-6600 で識別される融合細胞であることを特徴とする請求項 34 に記載の融合細胞。

【請求項 40】 該融合細胞が、国際寄託番号 FERM BP-6208 で識別される融合細胞であることを特徴とする請求項 34 に記載の融合細胞。

【請求項 41】 該融合細胞が、国際寄託番号 FERM BP-6209 で識別される融合細胞であることを特徴とする請求項 34 に記載の融合細胞。

【請求項 42】 請求項 1 乃至請求項 31 のいずれかに記載のモノクローナル抗体が固定化されていることを特徴とする抗体固定化不溶性担体。

【請求項 43】 不溶性担体が、プレート、試験管、チューブ、ビーズ、ボール、フィルター及びメンブレンからなる群から選ばれる不溶性担体であることを特徴とする請求項 42 に記載の抗体固定化不溶性担体。

【請求項 44】 不溶性担体が、フィルター若しくはメンブレン、またはア

フィニティーカラムクロマトグラフィーに用いられる不溶性担体であることを特徴とする請求項 4 2 に記載の抗体固定化不溶性担体。

【請求項 4 5】 請求項 1 乃至請求項 3 1 のいずれかに記載のモノクローナル抗体を、単独でまたは他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質で標識してなる標識抗体。

【請求項 4 6】 標識物質が、酵素、蛍光物質、化学発光物質、ビオチン、アビジン、または放射性同位体であることを特徴とする請求項 4 5 に記載の標識抗体。

【請求項 4 7】 請求項 1 乃至請求項 3 1 のいずれかに記載のモノクローナル抗体、請求項 4 2 若しくは請求項 4 3 に記載の抗体固定化不溶性担体、及び請求項 4 5 若しくは請求項 4 6 に記載の標識抗体からなる群から選ばれる少なくともいずれか 1 つのモノクローナル抗体、抗体固定化不溶性担体または標識抗体を含んでなることを特徴とする哺乳動物の C T G F の検出または定量に用いられるキット。

【請求項 4 8】 請求項 4 2 若しくは請求項 4 3 に記載の抗体固定化不溶性担体、及び請求項 4 5 若しくは請求項 4 6 に記載の標識抗体を含んでなることを特徴とする請求項 4 7 に記載の哺乳動物の C T G F の検出または定量に用いられるキット。

【請求項 4 9】 請求項 1 乃至請求項 3 1 のいずれかに記載のモノクローナル抗体、請求項 4 2 若しくは請求項 4 3 に記載の抗体固定化不溶性担体、及び請求項 4 5 若しくは請求項 4 6 に記載の標識抗体からなる群から選ばれる少なくともいずれか 1 つのモノクローナル抗体、抗体固定化不溶性担体、または標識抗体を用いることを特徴とするイムノアッセイにより哺乳動物の C T G F を検出または定量する方法。

【請求項 5 0】 少なくとも下記 (a) 及び (b) の工程を含むイムノアッセイにより哺乳動物の C T G F を検出または定量する請求項 4 9 に記載の方法：

(a) 請求項 4 2 または請求項 4 3 に記載の抗体固定化不溶性担体に、試料を反応せしめる工程；及び

(b) 該抗体固定化不溶性担体と該試料中に含まれる哺乳動物の C T G F と

の結合により形成される抗原抗体複合体に、請求項 45 または請求項 46 に記載の標識抗体を反応せしめる工程。

【請求項 51】 少なくとも下記 (a) 及び (b) の工程を含むイムノアッセイにより哺乳動物の C T G F を検出または定量する請求項 49 に記載の方法：

(a) 請求項 45 または請求項 46 に記載の標識抗体と、試料を反応せしめる工程；及び

(b) 該標識抗体と試料中に含まれる哺乳動物の C T G F との結合により形成される抗原抗体複合体に、請求項 42 または請求項 43 に記載の抗体固定化不溶性担体を反応せしめる工程。

【請求項 52】 少なくとも下記 (a) の工程を含むイムノアッセイにより哺乳動物の C T G F を検出または定量する請求項 49 に記載の方法：

(a) 請求項 42 若しくは請求項 43 に記載の抗体固定化不溶性担体、請求項 45 若しくは請求項 46 に記載の標識抗体、及び試料を含む混合物を反応せしめる工程。

【請求項 53】 少なくとも下記 (a) の工程を含むイムノアッセイにより哺乳動物の C T G F を検出または定量する請求項 49 に記載の方法：

(a) 請求項 42 または請求項 43 に記載の抗体固定化不溶性担体に、試料、並びに単独でまたは他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質で標識された哺乳動物の C T G F の標準物質を反応せしめる工程。

【請求項 54】 少なくとも下記 (a) 及び (b) の工程を含むイムノアッセイにより哺乳動物の C T G F を検出または定量する請求項 49 に記載の方法：

(a) 試料、並びに単独でまたは他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質で標識された哺乳動物の C T G F の標準物質との混合物に、請求項 1 乃至請求項 31 のいずれかに記載のモノクローナル抗体を反応せしめる工程；及び

(b) 該試料中に含まれる哺乳動物の C T G F 若しくは該標識された哺乳動物の C T G F の標準物質と、該モノクローナル抗体との結合により形成される抗原抗体複合体に、該モノクローナル抗体に反応性を有する哺乳動物由来の抗血清

を反応せしめる工程。

【請求項 55】 少なくとも下記 (a) 乃至 (c) の工程を含むイムノアッセイにより哺乳動物の CTGF を検出または定量する請求項 49 に記載の方法：

(a) 試料に、請求項 1 乃至請求項 31 のいずれかに記載のモノクローナル抗体を反応せしめる工程；

(b) (a) の工程を行った反応系に、単独でまたは他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質で標識された哺乳動物の CTGF の標準物質を反応せしめる工程；及び

(c) 該試料中に含まれる哺乳動物の CTGF 若しくは該標識された哺乳動物の CTGF の標準物質と、該モノクローナル抗体との結合により形成される抗原抗体複合体に、該モノクローナル抗体に反応性を有する哺乳動物由来の抗血清を反応せしめる工程。

【請求項 56】 請求項 42 または請求項 44 に記載の抗体固定化不溶性担体を含んでなる哺乳動物の CTGF の分離または精製に用いられるキット。

【請求項 57】 請求項 42 または請求項 44 に記載の抗体固定化不溶性担体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いることを特徴とする哺乳動物の CTGF を分離または精製する方法。

【請求項 58】 アフィニティークロマトグラフィーがアフィニティークラムクロマトグラフィーである請求項 57 に記載の哺乳動物の CTGF の精製方法。

【請求項 59】 ヒトの CTGF をコードする DNA が、内在性遺伝子座に組み込まれていることを特徴とするトランスジェニックマウス。

【請求項 60】 配列番号 2 に記載されるアミノ酸配列または該アミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するラットの CTGF。

【請求項 61】 配列番号 2 に記載されるアミノ酸配列を有するラットの CTGF をコードする DNA。

【請求項 62】 DNA が、配列番号 1 に記載される塩基配列中の塩基番号 213 乃至 1256 迄の塩基配列を含むことを特徴とする請求項 61 に記載の DNA。

【請求項 63】 請求項 2 乃至請求項 31 のいずれかに記載のモノクローナル抗体若しくはその一部、及び薬学的に許容されうる担体とを含んでなる医薬組

成物。

【請求項 64】 請求項 9 乃至請求項 18 または請求項 28 のいずれかに記載されるヒトモノクローナル抗体若しくはその一部、及び薬学的に許容され得る担体とを含んでなる医薬組成物。

【請求項 65】 請求項 14 乃至請求項 18 または請求項 28 のいずれかに記載されるヒトモノクローナル抗体若しくはその一部を含んでなる医薬組成物。

【請求項 66】 該医薬組成物が、CTGF の刺激により増殖する能力を有する細胞の増殖を抑制するために用いられることを特徴とする請求項 63 乃至請求項 65 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 67】 該医薬組成物が、CTGF の刺激により増殖する能力を有する細胞の増殖を伴う疾患を治療または予防するための請求項 63 乃至請求項 65 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 68】 該細胞の増殖が、脳、頸部、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、胃、大腸、小腸、十二指腸、骨髄、子宮、卵巣、精巣、前立腺、皮膚、口腔、舌、及び血管からなる群から選ばれる組織における細胞の増殖であることを特徴とする請求項 66 または請求項 67 に記載の医薬組成物。

【請求項 69】 該組織が、肺、肝臓、腎臓、または皮膚であることを特徴とする請求項 68 に記載の医薬組成物。

【請求項 70】 該組織が、腎臓であることを特徴とする請求項 69 に記載の医薬組成物。

【請求項 71】 該疾患が、さらに組織の繊維化を伴う疾患であることを特徴とする請求項 67 に記載の医薬組成物。

【請求項 72】 該組織の繊維化が、肺、肝臓、腎臓または皮膚における繊維化であることを特徴とする請求項 71 に記載の医薬組成物。

【請求項 73】 該組織の繊維化が、腎臓における繊維化であることを特徴とする請求項 72 に記載の医薬組成物。

【請求項 74】 CTGF 阻害剤または CTGF 産生阻害剤、並びに薬学的に許容され得る担体とを含んでなり、腎臓における疾患を治療または予防するための医薬組成物。

【請求項 75】 該阻害剤が、CTGF に反応性を有するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 74 に記載の医薬組成物。

【請求項 76】 該阻害剤が、請求項 9 乃至請求項 31 のいずれかに記載のモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 74 に記載の医薬組成物。

【請求項 77】 該阻害剤が、請求項 14 乃至請求項 18 または請求項 28 のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 76 に記載の医薬組成物。

【請求項 78】 該疾患が、組織の繊維化に伴う疾患であることを特徴とする請求項 74 乃至請求項 77 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 79】 CTGF の刺激により増殖する能力を有する細胞の CTGF の刺激による増殖を抑制する能力を有する物質、及び薬学的に許容され得る担体とを含んでなり、腎臓における該細胞の増殖を抑制するための医薬組成物。

【請求項 80】 該物質が、CTGF に反応性を有するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 79 に記載の医薬組成物。

【請求項 81】 該阻害剤が、請求項 9 乃至請求項 31 のいずれかに記載のモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 79 に記載の医薬組成物。

【請求項 82】 該阻害剤が、請求項 14 乃至請求項 18 または請求項 28 のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 81 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、哺乳動物の結合組織増殖因子 (Connective Tissue Growth Factor、CTGF) に反応性を有するモノクローナル抗体若しくはその一部、該モノクローナル抗体を産生する細胞、該モノクローナル抗体若しくはその一部を固定化してなる抗体固定化不溶性担体、該モノクローナル抗体を標識物質で標識してなる標識抗体、哺乳動物の CTGF の検出、定量、分離または精製に用いられるキット、哺乳動物の CTGF を検出、定量、分離または精製する方法、該モノクローナル抗体を含んでなる医薬組成物、ヒト CTGF 遺伝子導入トランスジェニック

クマウス、ラットのCTGFポリペプチド、ラットのCTGFをコードするDNA、及びラットのCTGFに反応性を有する抗体に関する。

【0002】

【従来の技術】

組織傷害における組織の再生は、傷害部位に移入したマクロファージ等の貪食細胞等による不用の組織片や細胞片あるいは細菌等の除去、血管系の復元、並びにそれに続く新しい組織との置換を経て行われる。この組織の再生、修復の過程においては、該再生・修復の過程で出現するマクロファージや好中球が産生するトランスフォーミング増殖因子 β (Transforming Growth Factor β (TGF- β)) が最初の調節因子として働くことが明らかとなってきた。

TGF- β の機能は多彩であり、間葉細胞の増殖誘導、血管内皮細胞及び上皮細胞の増殖抑制だけでなく、結合組織細胞からの細胞外マトリックス (Extracellular Matrix (ECM)) の産生を調節する機能を有することが知られている。

【0003】

前記TGF- β で刺激し増殖誘導が見られる間葉細胞の培養上清においては、血小板由来増殖因子 (Platelet-derived Growth Factor (PDGF)) や結合組織成長因子 (Connective Tissue Growth Factor (CTGF); Hcs 24とも呼ぶ) の産生の増加が観察されることから、TGF- β による細胞増殖誘導活性は、それらの他の制御因子により間接的に発揮されるものであると考えられている。

【0004】

CTGFについては、ヒト及びマウスのCTGFが既に同定されており (なお、ラットのCTGFの同定については、未だ何ら報告されていない。)、それらの物理化学的及び生物学的性状の解析が進められてきている ([ヒトCTGF] J. Cell Biology, Vol.114, No.6, p.1285-1294, 1991; Int. J. Biochem. Cell Biol., Vol.29, No.1, p.153-161, 1997; Circulation, Vol.95, No.4, p.831-839, 1997; Cell Growth Differ., Vol.7, No.4, p.469-480, 1996; J. Invest. Dermatol., Vol.106, No.4, p.729-733, 1996; J. Invest. Dermatol., Vol.105, No.2, p.280-284, 1995; J. Invest. Dermatol., Vol.105, No.1, p.128-132, 1995; 及び国際特許出願公開W096/38172号公報。 [マウスCTGF (Fisp12)

〕特開平5-255397号公報、Cell Growth Differ., Vol.2, No.5, p.225-233, 1991; FEBS Letters, Vol.327, No.2, p.125-130, 1993; 及びDNA Cell Biol., Vol.10, No.4, p.293-300, 1991)。

【0005】

CTGFは、分子量約38kDを有するシステイン残基に富んだ分泌型糖タンパクであり、その生合成及び分泌はTGF- β より誘導されることが明らかにされている。CTGFは、TGF- β による産生誘導を受ける点、PDGF受容体に結合する点、間葉細胞系の増殖を誘導する点、線維芽細胞や上皮細胞から産生されるという点等でPDGFと類似の性質を有するが、アミノ酸配列相同性はほとんど有さない全く異なる分子である(The Journal of Cell Biology, Vol.114, No.6, p.1287-1294, 1991及びMolecular Biology of the Cell, Vol.4, p.637-645, 1993)。

また、最近の研究により、ヒト及びマウス繊維芽細胞の培養上清中、並びにブタの子宮由来分泌液中には、38kDaのCTGFの分解物と考えられる生物学的に活性な分子量約10乃至12kDaの低分子量CTGFが同定されている(Growth Factors, Vol.15, No.3, p.199-213, 1998; J. Biol. Chem., Vol.272, No.32, p.20275-20282, 1997)。

【0006】

CTGFの生理学的機能及び疾患との関連性についての詳細は未だ完全に明らかにされてはいないものの、CTGFのTGF- β による産生誘導、種々の疾患患者の組織及び細胞におけるCTGFのmRNAの有意な発現(Int. J. Biochem. Cell. Biol., Vol.29, No.1, p.153-161, 1997; Circulation, Vol.95, No.4, p.831-839, 1997; J. Invest. Dermatol., Vol.106, No.4, p.729-733, 1996; J. Invest. Dermatol., Vol.105, No.2, p.128-132, 1995; J. Cell Physiol., Vol.165, No.3, p.556-565, 1995及びKidney Int., Vol.48, No.2, p.5001-5009, 1995など)、並びにCTGFの血管内皮細胞の遊走及び増殖の促進に関する知見(J. Cell. Biol., Vol.114, No.6, p.1285-1294, 1991; Exp. Cell Res., Vol.123, p.63-77, 1997; 歯科基礎医学会誌、第38巻、増刊、第463頁、PD0187、1996及び第69回日本生化学会要旨、第683頁、1P0535、1996など)等から、

CTGFが種々疾患の発症及び／または進行に関与する可能性が示唆され初めてきている。

【0007】

具体的疾患の特定については、今後の研究展開及び研究結果を待たなければならないが、CTGFは、例えば、癌、動脈硬化症、皮膚疾患（例えば、乾癬、強皮症、アトピー、ケロイド）、腎疾患、関節炎（例えば、慢性関節リウマチ）、各種線維症（動脈硬化、肝硬変、関節炎、強皮症、ケロイド、腎線維化、及び肺線維症等で見られる組織線維化）等の幅広い範囲の疾患の発症及び／または進行に関与するのではないかと推測される。

【0008】

このような各種疾患とCTGFとの係わりの解明においては、種々の疾患に罹患している患者及び疾患哺乳動物の体液（血清など）中に含まれるCTGF及び／またはその断片を検出及び定量し、その値を、正常な生体（健常人、正常マウス、正常ラット、及び正常ウサギ等の哺乳動物）における測定値と比較することが、有効な一般的な手段である。

CTGFのような分泌性タンパクの検出あるいは定量には、検出しようとする分泌性タンパクに対する抗体（特には、モノクローナル抗体）を用いた抗原抗体反応に基づく免疫学的測定方法、具体的には、ラジオイムノアッセイ（RIA）あるいはエンザイムイムノアッセイ（EIA、ELISA）等のイムノアッセイが、最も簡便で有用な方法として汎用されている。

【0009】

同様に、CTGFの検出及び定量においても、このようなイムノアッセイによる検出方法及び定量方法、該定量方法の確立に必要とされるCTGFに対するモノクローナル抗体の作製、開発が必要となる。しかしながら、CTGFに対する抗体については、抗血清の作製についての報告はあるものの（Exp. Cell Res., Vol.233, p.63-77, 1997; Cell Growth Differ., Vol.8, No.1, p.61-68, 1997; 及び第69回日本生化学会要旨、第683頁、1P0534、1996）、モノクローナル抗体、とりわけCTGFに対する高い親和性及び／またはCTGFの活性を中和する能力を有する機能的なモノクローナル抗体については未だ報告されておらず

、イムノアッセイによるCTGFの定量系も全く提供されていない。

また、前記のようなCTGFの活性を中和する能力を有するモノクローナル抗体は、そのようなイムノアッセイにおける構成要素としてだけでなく、前述のようなCTGFの分泌に起因する各種疾患の治療及び／または予防における抗体医薬品として有用であるが、該抗体医薬品として使用可能なモノクローナル抗体についても、全く報告されていない。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

従って、前記のような種々疾患の発症及び／または進行に関連する可能性を有するCTGFの生物学的機能及び該CTGFと各種疾患との因果関係の解明、並びにCTGFに起因する疾患の治療及び予防における医薬品の有効成分として使用可能な、ヒト、マウス、ラット及びウサギ等の各種哺乳動物のCTGFに反応性を有するモノクローナル抗体の開発が望まれている。特に、CTGFの機能及びCTGFと各種疾患との関係の解明において必要な手段であるCTGFのイムノアッセイにおいて用いられるモノクローナル抗体としては、該CTGFに対する所望の親和性、CTGFの生物学的活性を中和する能力、及び／または種々の哺乳動物に対する所望の交叉反応性（cross reactivity）を有するモノクローナル抗体の開発が求められている。

さらに、該種々疾患に罹患している患者の治療及び／または予防に用いられるモノクローナル抗体としては、該中和活性に加え、該患者に対する抗原性を低減または消失させたモノクローナル抗体の開発が求められている。

【0011】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上述のような社会的ニーズを満たすために、各種哺乳動物のCTGFに対するモノクローナル抗体に関して鋭意研究した結果、種々の哺乳動物に由来するCTGFを免疫原として用いることにより、抗原特異性、抗原親和性、中和活性、及び交叉反応性等の性質の点で、各々異なる特性を有する種々の哺乳動物のCTGFに対する種々のモノクローナル抗体を作製することに成功した。

また、遺伝子組換え技術を用いてヒトの抗体を産生するように作製したトランスジェニックマウスをヒトのCTGFで免疫することによって、ヒトCTGFに対する種々のヒトモノクローナル抗体を作製することに世界に先んじて初めて成功した。

【0012】

さらに、前者の種々のモノクローナル抗体を用いて構築した種々のイムノアッセイ系により、種々哺乳動物（ヒト、マウス、ラット及びウサギ等）の体液（血清等）中のCTGFを、インタクトな状態で簡便かつ高感度で定量できることを見出し本発明を完成するに到った。

また、後者のヒト抗体が、ヒトCTGFの活性を有意に中和するのみならず、例えば、組織繊維症（例えば、腎繊維症など）の治療効果を有することを見出し、本願発明を完成するに到った。これらのヒト抗体は、マウス由来の抗体等の非ヒト哺乳動物由来の抗体からなる抗体医薬品の治療上の大きな問題点（副作用）であったヒトに対する抗原性を全く有しないことから、抗体の医薬品としての価値を劇的に増大させるものである。

【0013】

即ち、本発明は、患者の治療及び予防における医薬品として、またヒト、マウス及びラット等の各種哺乳動物の体液中に含まれるCTGFを検出及び定量するためのイムノアッセイにおける構成要素として有用な種々の特性を有する各種哺乳動物に対するモノクローナル抗体を、本発明の分野において初めて提供するものである。

さらに、本発明は、そのようなCTGFに対する種々のモノクローナル抗体を用いることによるCTGFのイムノアッセイ方法及びアッセイキットを初めて提供するものである。

【0014】

本発明のヒトCTGFに対するモノクローナル抗体は、ヒトに対する抗原性を惹起することなく、CTGFに起因する種々の疾患の治療及び予防するための医薬品として極めて有用である。

また、本発明のモノクローナル抗体を用いたイムノアッセイにより、ヒトは勿

論、種々哺乳動物（ヒト、マウス、ラット及びウサギなど）の正常な生体並びに疾患に罹患している生体の体液中に存在するCTGFを、インタクト（intact）な状態で簡便かつ高感度で検出及び定量できる。

【0015】

即ち、本発明の下記のと通りの発明である。

（１） 下記の（a）乃至（g）のいずれかに記載の性質を有することを特徴とするモノクローナル抗体またはその一部：

（a）ヒト、マウス及びラットの結合組織増殖因子（CTGF）のいずれにも反応性を有する；

（b）ヒト及びマウスのCTGFのいずれにも反応性を有し、且つラットのCTGFに反応性を有しない；

（c）マウス及びラットのCTGFのいずれにも反応性を有し、且つヒトのCTGFに反応性を有しない；

（d）ヒト腎臓由来線維芽細胞株293-T（ATCC CRL-1573）とヒトのCTGFとの結合、または該細胞株293-TとマウスのCTGFとの結合を阻害する；

（e）ラット腎臓由来線維芽細胞株NRK-49F（ATCC CRL-1570）、ヒト骨肉腫由来細胞株MG-63（ATCC CRL-1427）またはヒト肺由来線維芽細胞のいずれかとヒトのCTGFとの結合を阻害する；

（f）ヒトのCTGFまたはマウスのCTGFの刺激によるラット腎臓由来線維芽NRK-49F（ATCC CRL-1570）の細胞増殖を阻害する；または

（g）ヒドロキシプロリンの生成が上昇的傾向を示している腎臓における該ヒドロキシプロリンの上昇を抑制する。

（２） モノクローナル抗体が、下記の（a）乃至（c）のいずれかに記載の性質を有することを特徴とする前記（１）に記載のモノクローナル抗体またはその一部：

（a）ヒトのCTGFまたはその一部をマウスに免疫して得られるモノクローナル抗体またはその一部であって、ヒト、マウス及びラットのCTGFのいずれにも反応性を有する；

（b）マウスのCTGFまたはその一部をハムスターに免疫して得られる

モノクローナル抗体またはその一部であって、ヒト、マウス及びラットのCTGFのいずれにも反応性を有する；または

(c) マウスのCTGFまたはその一部をラットに免疫して得られるモノクローナル抗体またはその一部であって、ヒト、マウス及びラットのCTGFのいずれにも反応性を有する。

(3) モノクローナル抗体が、下記の(a)乃至(c)のいずれかに記載の性質を有することを特徴とする前記(1)に記載のモノクローナル抗体またはその一部：

(a) ヒトのCTGFまたはその一部をマウスに免疫して得られるモノクローナル抗体であって、ヒト、マウス及びラットのCTGFのいずれにも反応性を有し、且つヒト腎臓由来線維芽細胞株293-T(ATCC CRL-1573)とヒトのCTGFとの結合を阻害する；

(b) マウスのCTGFまたはその一部をラットに免疫して得られるモノクローナル抗体であって、ヒト、マウス及びラットのCTGFのいずれにも反応性を有し、且つヒト腎臓由来線維芽細胞株293-T(ATCC CRL-1573)とマウスのCTGFとの結合を阻害する；または

(c) マウスのCTGFまたはその一部をハムスターに免疫して得られるモノクローナル抗体であって、ヒト、マウス及びラットのCTGFのいずれにも反応性を有し、且つヒト腎臓由来線維芽細胞株293-T(ATCC CRL-1573)とマウスのCTGFとの結合を阻害する

(4) 該モノクローナル抗体が、国際寄託番号FERM BP-6208で識別される融合細胞から産生されるモノクローナル抗体であることを特徴とする前記(1)に記載のモノクローナル抗体またはその一部。

(5) 該モノクローナル抗体が、国際寄託番号FERM BP-6208で識別される融合細胞から産生されるモノクローナル抗体と実質的に同一の性質を有するモノクローナル抗体であることを特徴とする前記(1)に記載のモノクローナル抗体またはその一部。

(6) 該モノクローナル抗体が、国際寄託番号FERM BP-6209で識別される融合細胞から産生されるモノクローナル抗体であることを特徴とする前記(1)に

記載のモノクローナル抗体またはその一部。

(7) 該モノクローナル抗体が、国際寄託番号FERM BP-6209で識別される融合細胞から産生されるモノクローナル抗体と実質的に同一の性質を有するモノクローナル抗体であることを特徴とする前記(1)に記載のモノクローナル抗体またはその一部。

(8) ヒト、マウス、またはラットのCTGFのいずれかに反応性を有するヒトモノクローナル抗体またはその一部。

(9) ヒトモノクローナル抗体が、ヒトのCTGFに反応性を有するモノクローナル抗体であることを特徴とする前記(8)に記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。

(10) 下記の(a)乃至(d)のいずれかに記載の性質を有するヒトのCTGFに反応性を有するヒトモノクローナル抗体またはその一部：

(a) ヒト腎臓由来線維芽細胞株293-T(ATCC CRL-1573)とヒトのCTGFとの結合を阻害する；

(b) ラット腎臓由来線維芽細胞株NRK-49F(ATCC CRL-1570)、ヒト骨肉腫由来細胞株MG-63(ATCC CRL-1427)またはヒト肺由来線維芽細胞のいずれかとヒトのCTGFとの結合を阻害する；

(c) ヒトのCTGFまたはマウスのCTGFの刺激によるラット腎臓由来線維芽NRK-49F(ATCC CRL-1570)の細胞増殖を阻害する；または

(d) ヒドロキシプロリンの生成が上昇的傾向を示している腎臓における該ヒドロキシプロリンの上昇を抑制する。

(11) ヒトモノクローナル抗体が、ヒト抗体を産生する能力を有するトランスジェニック非ヒト哺乳動物に由来するモノクローナル抗体であることを特徴とする前記(8)乃至前記(10)のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。

(12) ヒトモノクローナル抗体が、ヒトのCTGFを、ヒト抗体を産生する能力を有するトランスジェニック非ヒト哺乳動物に免疫することにより得られるモノクローナル抗体であることを特徴とする前記(11)に記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。

(13) トランスジェニック非ヒト哺乳動物が、トランスジェニックマウスであることを特徴とする前記(8)乃至前記(12)のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。

(14) 該ヒトモノクローナル抗体の重鎖可変領域をコードするV領域のDNAが、DP-5、DP-38、DP-65及びDP-75からなる群から選ばれるいずれかの遺伝子セグメントに由来することを特徴とする前記(8)乃至前記(13)のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。

(15) 該ヒトモノクローナル抗体の軽鎖可変領域をコードするV領域のDNAが、DPK1、DPK9、DPK12及びDPK24からなる群から選ばれるいずれかの遺伝子セグメントに由来することを特徴とする前記(8)乃至前記(13)のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。

(16) 該ヒトモノクローナル抗体の重鎖可変領域をコードするV領域のDNAが、DP-5、DP-38、DP-65及びDP-75からなる群から選ばれるいずれかの遺伝子セグメントに由来し、且つ該ヒトモノクローナル抗体の軽鎖可変領域をコードするV領域のDNAが、DPK1、DPK9、DPK12及びDPK24からなる群から選ばれるいずれかの遺伝子セグメントに由来することを特徴とする前記(8)乃至前記(15)のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部。

(17) 該ヒトモノクローナルの重鎖可変領域が、下記(a)乃至(j)のいずれかのアミノ酸配列を含むアミノ酸を有することを特徴とする前記(9)に記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部：

(a) 配列番号6に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号21乃至120番目のアミノ酸配列；

(b) 配列番号6に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号21乃至120番目のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列；

(c) 配列番号8に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号21乃至118番目のアミノ酸配列；

(d) 配列番号8に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号21乃至118番目のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入

若しくは付加されたアミノ酸配列；

(e) 配列番号 10 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 116 番目のアミノ酸配列；

(f) 配列番号 10 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 116 番目のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列；

(g) 配列番号 12 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 116 番目のアミノ酸配列；

(h) 配列番号 12 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 116 番目のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列；

(i) 配列番号 14 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 117 番目のアミノ酸配列；または

(j) 配列番号 14 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 117 番目のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列。

(18) 該ヒトモノクローナルの軽鎖可変領域が、下記 (a) 乃至 (j) のいずれかのアミノ酸配列を含むアミノ酸を有することを特徴とする前記 (9) に記載のヒトモノクローナル抗体またはその一部；

(a) 配列番号 16 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 120 番目のアミノ酸配列；

(b) 配列番号 16 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 120 番目のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列；

(c) 配列番号 18 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 121 番目のアミノ酸配列；

(d) 配列番号 18 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 21 乃至 121 番目のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列；

(e) 配列番号 20 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 23 乃至 117 番目のアミノ酸配列；

(f) 配列番号 20 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 23 乃至 117 番目のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列；

(g) 配列番号 22 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 17 乃至 111 番目のアミノ酸配列；

(h) 配列番号 22 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 17 乃至 111 番目のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列；

(i) 配列番号 24 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 23 乃至 118 番目のアミノ酸配列；または

(j) 配列番号 24 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 23 乃至 118 番目のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列。

(19) ヒトの CTGF に反応性を有するモノクローナル抗体であって、国際寄託番号 FERM BP-6535 で識別される融合細胞から産生されるモノクローナル抗体またはその一部。

(20) ヒトの CTGF に反応性を有するモノクローナル抗体であって、国際寄託番号 FERM BP-6535 で識別される融合細胞から産生されるモノクローナル抗体と実質的に同一の性質を有するモノクローナル抗体またはその一部。

(21) ヒトの CTGF に反応性を有するモノクローナル抗体であって、国際寄託番号 FERM BP-6598 で識別される融合細胞から産生されるモノクローナル抗体またはその一部。

(22) ヒトの CTGF に反応性を有するモノクローナル抗体であって、国際寄託番号 FERM BP-6598 で識別される融合細胞から産生されるモノクローナル抗体と実質的に同一の性質を有するモノクローナル抗体またはその一部。

(23) ヒトの CTGF に反応性を有するモノクローナル抗体であって、国際寄託番号 FERM BP-6599 で識別される融合細胞から産生されるモノクローナル抗

体またはその一部。

(24) ヒトのCTGFに反応性を有するモノクローナル抗体であって、国際寄託番号FERM BP-6599で識別される融合細胞から産生されるモノクローナル抗体と実質的に同一の性質を有するモノクローナル抗体またはその一部。

(25) ヒトのCTGFに反応性を有するモノクローナル抗体であって、国際寄託番号FERM BP-6600で識別される融合細胞から産生されるモノクローナル抗体またはその一部。

(26) ヒトのCTGFに反応性を有するモノクローナル抗体であって、国際寄託番号FERM BP-6600で識別される融合細胞から産生されるモノクローナル抗体と実質的に同一の性質を有するモノクローナル抗体またはその一部。

(27) ヒトのCTGFに反応性を有するモノクローナル抗体またはその一部であって、該モノクローナル抗体が、該モノクローナル抗体をヒトのCTGFに反応性を有する前記(17)若しくは前記(18)に記載のいずれかのモノクローナル抗体とヒトのCTGFからなる抗原抗体複合体に反応させた時、該抗原抗体複合体に反応性を有しないことを特徴とするモノクローナル抗体またはその一部。

(28) 該モノクローナル抗体が、ヒトモノクローナル抗体であることを特徴とする前記(27)に記載のモノクローナル抗体またはその一部。

(29) ラットのCTGFに反応性を有するモノクローナル抗体またはその一部。

(30) 可変領域が前記(2)乃至前記(7)、前記(27)または前記(29)のいずれかに記載のモノクローナル抗体由来の可変領域であり、かつ定常領域がヒトイムノグロブリン由来の定常領域であることを特徴とするヒトのCTGFに反応性を有する組換えキメラモノクローナル抗体。

(31) 超可変領域の相補性決定領域の一部または全部が前記(2)乃至前記(7)、前記(27)または前記(29)のいずれかに記載のモノクローナル抗体由来の相補性決定領域であり、超可変領域の枠組領域がヒトイムノグロブリン由来の枠組領域であり、かつ定常領域がヒトイムノグロブリン由来の定常領域であることを特徴とするヒトのCTGFに反応性を有する組換えヒト型モノクロ

ーナル抗体。

(32) 前記(1)乃至前記(29)のいずれかに記載のモノクローナル抗体を産生する細胞。

~~(33) 前記(30)または前記(31)に記載の組換えモノクローナル抗体を産生する細胞。~~

(34) 該細胞が、該モノクローナル抗体を産生する能力を哺乳動物由来のB細胞と哺乳動物由来のミエローマ細胞とを融合して得られる融合細胞であることを特徴とする前記(32)に記載の細胞。

(35) 該細胞が、該モノクローナル抗体の重鎖をコードするDNA若しくはその軽鎖をコードするDNAのいずれか一方のDNA、または両方のDNAが細胞内に導入されることにより形質転換された遺伝子組換え細胞であることを特徴とする前記(32)または前記(33)に記載の細胞。

(36) 該融合細胞が、国際寄託番号FERM BP-6535で識別される融合細胞であることを特徴とする前記(34)に記載の融合細胞。

(37) 該融合細胞が、国際寄託番号FERM BP-6598で識別される融合細胞であることを特徴とする前記(34)に記載の融合細胞。

(38) 該融合細胞が、国際寄託番号FERM BP-6599で識別される融合細胞であることを特徴とする前記(34)に記載の融合細胞。

(39) 該融合細胞が、国際寄託番号FERM BP-6600で識別される融合細胞であることを特徴とする前記(34)に記載の融合細胞。

(40) 該融合細胞が、国際寄託番号FERM BP-6208で識別される融合細胞であることを特徴とする前記(34)に記載の融合細胞。

(41) 該融合細胞が、国際寄託番号FERM BP-6209で識別される融合細胞であることを特徴とする前記(34)に記載の融合細胞。

(42) 前記(1)乃至前記(31)のいずれかに記載のモノクローナル抗体が固定化されていることを特徴とする抗体固定化不溶性担体。

(43) 不溶性担体が、プレート、試験管、チューブ、ビーズ、ボール、フィルター及びメンブレンからなる群から選ばれる不溶性担体であることを特徴とする前記(42)に記載の抗体固定化不溶性担体。

(44) 不溶性担体が、フィルター若しくはメンブレン、またはアフィニティカラムクロマトグラフィーに用いられる不溶性担体であることを特徴とする前記(42)に記載の抗体固定化不溶性担体。

(45) 前記(1)乃至前記(31)のいずれかに記載のモノクローナル抗体を、単独でまたは他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質で標識してなる標識抗体。

(46) 標識物質が、酵素、蛍光物質、化学発光物質、ビオチン、アビジン、または放射性同位体であることを特徴とする前記(45)に記載の標識抗体。

(47) 前記(1)乃至前記(31)のいずれかに記載のモノクローナル抗体、前記(42)若しくは前記(43)に記載の抗体固定化不溶性担体、及び前記(45)若しくは前記(46)に記載の標識抗体からなる群から選ばれる少なくともいずれか1つのモノクローナル抗体、抗体固定化不溶性担体または標識抗体を含んでなることを特徴とする哺乳動物のCTGFの検出または定量に用いられるキット。

(48) 前記(42)若しくは前記(43)に記載の抗体固定化不溶性担体、及び前記(45)若しくは前記(46)に記載の標識抗体を含んでなることを特徴とする前記(47)に記載の哺乳動物のCTGFの検出または定量に用いられるキット。

(49) 前記(1)乃至前記(31)のいずれかに記載のモノクローナル抗体、前記(42)若しくは前記(43)に記載の抗体固定化不溶性担体、及び前記(45)若しくは前記(46)に記載の標識抗体からなる群から選ばれる少なくともいずれか1つのモノクローナル抗体、抗体固定化不溶性担体、または標識抗体を用いることを特徴とするイムノアッセイにより哺乳動物のCTGFを検出または定量する方法。

(50) 少なくとも下記(a)及び(b)の工程を含むイムノアッセイにより哺乳動物のCTGFを検出または定量する前記(49)に記載の方法：

(a) 前記(42)または前記(43)に記載の抗体固定化不溶性担体に、試料を反応せしめる工程；及び

(b) 該抗体固定化不溶性担体と該試料中に含まれる哺乳動物のCTGF

との結合により形成される抗原抗体複合体に、前記（４５）または前記（４６）に記載の標識抗体を反応せしめる工程。

（５１） 少なくとも下記（ａ）及び（ｂ）の工程を含むイムノアッセイにより哺乳動物のＣＴＧＦを検出または定量する前記（４９）に記載の方法：

（ａ）前記（４５）または前記（４６）に記載の標識抗体と、試料を反応せしめる工程；及び

（ｂ）該標識抗体と試料中に含まれる哺乳動物のＣＴＧＦとの結合により形成される抗原抗体複合体に、前記（４２）または前記（４３）に記載の抗体固定化不溶性担体を反応せしめる工程。

（５２） 少なくとも下記（ａ）の工程を含むイムノアッセイにより哺乳動物のＣＴＧＦを検出または定量する前記（４９）に記載の方法：

（ａ）前記（４２）若しくは前記（４３）に記載の抗体固定化不溶性担体、前記（４５）若しくは前記（４６）に記載の標識抗体、及び試料を含む混合物を反応せしめる工程。

（５３） 少なくとも下記（ａ）の工程を含むイムノアッセイにより哺乳動物のＣＴＧＦを検出または定量する前記（４９）に記載の方法：

（ａ）前記（４２）または前記（４３）に記載の抗体固定化不溶性担体に、試料、並びに単独でまたは他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質で標識された哺乳動物のＣＴＧＦの標準物質を反応せしめる工程。

（５４） 少なくとも下記（ａ）及び（ｂ）の工程を含むイムノアッセイにより哺乳動物のＣＴＧＦを検出または定量する前記（４９）に記載の方法：

（ａ）試料、並びに単独でまたは他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質で標識された哺乳動物のＣＴＧＦの標準物質との混合物に、前記（１）乃至前記（３１）のいずれかに記載のモノクローナル抗体を反応せしめる工程；及び

（ｂ）該試料中に含まれる哺乳動物のＣＴＧＦ若しくは該標識された哺乳動物のＣＴＧＦの標準物質と、該モノクローナル抗体との結合により形成される抗原抗体複合体に、該モノクローナル抗体に反応性を有する哺乳動物由来の抗血

清を反応せしめる工程。

(55) 少なくとも下記 (a) 乃至 (c) の工程を含むイムノアッセイにより哺乳動物のCTGFを検出または定量する前記(49)に記載の方法：

(a) 試料に、前記(1)乃至前記(31)のいずれかに記載のモノクローナル抗体を反応せしめる工程；

(b) (a) の工程を行った反応系に、単独でまたは他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質で標識された哺乳動物のCTGFの標準物質を反応せしめる工程；及び

(c) 該試料中に含まれる哺乳動物のCTGF若しくは該標識された哺乳動物のCTGFの標準物質と、該モノクローナル抗体との結合により形成される抗原抗体複合体に、該モノクローナル抗体に反応性を有する哺乳動物由来の抗血清を反応せしめる工程。

(56) 前記(42)または前記(44)に記載の抗体固定化不溶性担体を含んでなる哺乳動物のCTGFの分離または精製に用いられるキット。

(57) 前記(42)または前記(44)に記載の抗体固定化不溶性担体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いることを特徴とする哺乳動物のCTGFを分離または精製する方法。

(58) アフィニティークロマトグラフィーがアフィニティークラムクロマトグラフィーである前記(57)に記載の哺乳動物のCTGFの精製方法。

(59) ヒトのCTGFをコードするDNAが、内在性遺伝子座に組み込まれていることを特徴とするトランスジェニックマウス。

(60) 配列番号2に記載されるアミノ酸配列または該アミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するラットのCTGF。

(61) 配列番号2に記載されるアミノ酸配列を有するラットのCTGFをコードするDNA。

(62) DNAが、配列番号1に記載される塩基配列中の塩基番号213乃至1256迄の塩基配列を含むことを特徴とする前記(61)に記載のDNA。

(63) 前記(2)乃至前記(31)のいずれかに記載のモノクローナル抗体若しくはその一部、及び薬学的に許容されうる担体とを含んでなる医薬組成物

(64) 前記(9)乃至前記(18)または前記(28)のいずれかに記載されるヒトモノクローナル抗体若しくはその一部、及び薬学的に許容され得る担体とを含んでなる医薬組成物。

(65) 前記(14)乃至前記(18)または前記(28)のいずれかに記載されるヒトモノクローナル抗体若しくはその一部を含んでなる医薬組成物。

(66) 該医薬組成物が、CTGFの刺激により増殖する能力を有する細胞の増殖を抑制するために用いられることを特徴とする前記(63)乃至前記(65)のいずれかに記載の医薬組成物。

(67) 該医薬組成物が、CTGFの刺激により増殖する能力を有する細胞の増殖を伴う疾患を治療または予防するための前記(63)乃至前記(65)のいずれかに記載の医薬組成物。

(68) 該細胞の増殖が、脳、頸部、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、胃、大腸、小腸、十二指腸、骨髄、子宮、卵巣、精巣、前立腺、皮膚、口腔、舌、及び血管からなる群から選ばれる組織における細胞の増殖であることを特徴とする前記(66)または前記(67)に記載の医薬組成物。

(69) 該組織が、肺、肝臓、腎臓、または皮膚であることを特徴とする前記(68)に記載の医薬組成物。

(70) 該組織が、腎臓であることを特徴とする前記(69)に記載の医薬組成物。

(71) 該疾患が、さらに組織の繊維化を伴う疾患であることを特徴とする前記(67)に記載の医薬組成物。

(72) 該組織の繊維化が、肺、肝臓、腎臓または皮膚における繊維化であることを特徴とする前記(71)に記載の医薬組成物。

(73) 該組織の繊維化が、腎臓における繊維化であることを特徴とする前記(72)に記載の医薬組成物。

(74) CTGF阻害剤またはCTGF産生阻害剤、並びに薬学的に許容され得る担体とを含んでなり、腎臓における疾患を治療または予防するための医薬組成物。

(75) 該阻害剤が、CTGFに反応性を有するモノクローナル抗体であることを特徴とする前記(74)に記載の医薬組成物。

(76) 該阻害剤が、前記(9)乃至前記(31)のいずれかに記載のモノクローナル抗体であることを特徴とする前記(74)に記載の医薬組成物。

(77) 該阻害剤が、前記(14)乃至前記(18)または前記(28)のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体であることを特徴とする前記(76)に記載の医薬組成物。

(78) 該疾患が、組織の繊維化に伴う疾患であることを特徴とする前記(74)乃至前記(77)のいずれかに記載の医薬組成物。

(79) CTGFの刺激により増殖する能力を有する細胞のCTGFの刺激による増殖を抑制する能力を有する物質、及び薬学的に許容され得る担体とを含んでなり、腎臓における該細胞の増殖を抑制するための医薬組成物。

(80) 該物質が、CTGFに反応性を有するモノクローナル抗体であることを特徴とする前記(79)に記載の医薬組成物。

(81) 該阻害剤が、前記(9)乃至前記(31)のいずれかに記載のモノクローナル抗体であることを特徴とする前記(79)に記載の医薬組成物。

(82) 該阻害剤が、前記(14)乃至前記(18)または前記(28)のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体であることを特徴とする前記(81)に記載の医薬組成物。

【0016】

【発明の実施の形態】

以下、本発明で用いる語句の意味を明らかにすることにより、本発明を詳細に説明する。

本発明における「哺乳動物」とは、ヒト、ウシ、ヤギ、ウサギ、マウス、ラット、ハムスター、及びモルモット等を意味し、好ましくは、ヒト、ウサギ、ラット、ハムスターまたはマウスであり、特に好ましくは、ヒト、ラット、ハムスターまたはマウスである。

本発明で用いられる「ヒト以外の哺乳動物」及び「非ヒト哺乳動物」なる用語は各々同義であり、前述に定義した哺乳動物におけるヒト以外のあらゆる哺乳動

物を意味する。

【0017】

本発明において用いられる「アミノ酸」とは、自然界に存在するあらゆるアミノ酸を意味し、好ましくは、アミノ酸を表記するために用いられるアルファベットの三文字表記法または一文字表記法に従って各々下記のように表されるアミノ酸を意味する。

グリシン (Gly/G)、アラニン (Ala/A)、バリン (Val/V)、ロイシン (Leu/L)、イソロイシン (Ile/I)、セリン (Ser/S)、スレオニン (Thr/T)、アスパラギン酸 (Asp/D)、グルタミン酸 (Glu/E)、アスパラギン (Asn/N)、グルタミン (Glu/Q)、リジン (Lys/K)、アルギニン (Arg/R)、システイン (Cys/C)、メチオニン (Met/M)、フェニルアラニン (Phe/F)、チロシン (Tyr/Y)、トリプトファン (Trp/W)、ヒスチジン (His/H)、プロリン (Pro/P)。

【0018】

本発明でいう「結合組織増殖因子 (Connective Tissue Growth Factor (CTGF))」とは、前記哺乳動物のCTGFであり、例えば、前述に記載したとおりの既報に報告される構造及び機能を有するヒト及びマウスのCTGFを包含する（例えば、The Journal of Cell Biology, Vol.114, No.6, p.1287-1294, 1991、Molecular Biology of the Cell, Vol.4, p.637-645, 1993、及びBiochem. Biophys. Res. Comm., Vol.234, p.206-210, 1997など）。また、本願発明の1つであるラットのCTGFも包含することは言うまでもない。

【0019】

また、本発明で言う結合組織増殖因子には、当該文献に記載された分子量約38kDaのCTGF（例えば、ヒトCTGF）はもちろんのこと、当該分子量約38kDaの全長CTGF（例えば、ヒトCTGF）の分解物と考えられる分子量約10乃至12kDaの低分子量CTGF蛋白をも包含する（Growth Factors, Vol.15, No.3, p.199-213, 1998; J. Biol. Chem., Vol.272, No.32, p.20275-20282, 1997）。この低分子量CTGFの構造は未だ明らかにされていないものの、ヒトCTGFにあっては、349アミノ酸からなる全長ヒトCTGFの246番目のロイシン (Leu246) と24

7番目のグルタミン酸 (Glu247) の間で切断されることにより生ずると考えられる103個のアミノ酸からなるC末端蛋白 (分子量: 約11,800Da)、あるいは、同全長ヒトCTGFの247番目のグルタミン酸 (Glu247) と248番目のグルタミン酸 (Glu248) との間で切断されることにより生ずると考えられる102個のアミノ酸からなるC末端蛋白 (分子量: 約11,671Da) である可能性を有する。

さらに、後述する本願発明に係る「モノクローナル抗体」が天然型のタンパク一次構造 (アミノ酸配列) を有するCTGF (特には、ヒトCTGF) またはその一部に反応性を有する限り、本発明でいう該CTGFには、該天然型のタンパクまたはその一部のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するCTGFも包含する。

【0020】

本発明において使用される、「実質的に同一のアミノ酸配列を有する」なる用語は、天然型のCTGFと実質的に同等の生物学的性質を有する限り、該アミノ酸配列中の複数個のアミノ酸、好ましくは1乃至10個のアミノ酸、特に好ましくは1乃至5個のアミノ酸が置換、欠失及び/または修飾されているアミノ酸配列を有するタンパク、並びに該アミノ酸配列に、複数個のアミノ酸、好ましくは1乃至10個のアミノ酸、特に好ましくは1乃至5個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を有するタンパクをも包含することを意味する。さらに、そのような置換、欠失、修飾及び付加の複数の組み合わせの場合であってもよい。

本発明におけるCTGFは、遺伝子組換え技術のほか、化学的合成法、細胞培養方法等のような当該技術的分野において知られる公知の方法あるいはその修飾方法を適宜用いることにより製造することができる。

【0021】

また、本発明におけるCTGFには、該CTGFの「一部」も包含される。ここで「CTGFの一部」とは、前記に定義したCTGF (前述の分子量約10乃至12kDaの低分子量CTGFを含む) のアミノ酸配列中の任意の部分配列を含むポリペプチドを意味し、具体的には5乃至100アミノ酸残基を有するCTGFペプチドフラグメント (例えば、C末端側)、より具体的には5乃至50アミノ酸残基を有するCTGFペプチドフラグメント、さらに具体的には5乃至30アミ

ノ酸残基を有するペプチドフラグメントが包含される。好ましくは、CTGFがその受容体と結合若しくは相互作用する部位（受容体結合部位など）またはCTGFがその生物学的機能を発揮するために必要な部位（活性部位など）を含むCTGFの部分構造である。

これらのポリペプチド（部分構造、フラグメント）は、後述する当該技術的分野において知られる公知の方法あるいはその修飾方法に従って、遺伝子組換え技術または化学的合成法により製造することもできるし、また細胞培養方法により単離したCTGFをタンパク分解酵素等を用いて適切に切断することにより製造することができる。

【0022】

本発明における「モノクローナル抗体」とは、哺乳動物の結合組織増殖因子（CTGF）またはその一部に反応性を有するモノクローナル抗体である。具体的には、前記発明（1）乃至前記発明（31）のいずれかに記載される特徴を有するモノクローナル抗体である。さらに具体的には、後述の実施例並びに図面に記載されるような様々な特性及び産業上の有用性を有する各種のモノクローナル抗体である。

【0023】

本発明のモノクローナル抗体における好ましい態様としては、例えば、下記（イ）乃至（二）のモノクローナル抗体が挙げられる。

（イ） 前記（1）に記載のモノクローナル抗体における（d）乃至（g）のいずれかの性質を有するモノクローナル抗体。

（ロ） 前記（2）に記載のモノクローナル抗体。

（ハ） 前記（4）乃至前記（7）のいずれかに記載されるモノクローナル抗体。

（二） 前記（9）乃至前記（31）のいずれかに記載されるモノクローナル抗体。

本態様において、種々疾患の治療または予防、即ち医薬品としての適用の目的における使用においては、上記（イ）乃至（二）に記載のモノクローナル抗体に包含されるヒトモノクローナル抗体が好ましい。

本態様において、本願発明の別の主題である哺乳動物のCTGFの定量、検出、分離または精製の目的における使用においては、上記（イ）乃至（二）に記載のいずれのモノクローナル抗体をも使用し得る。

【0024】

本願発明のモノクローナル抗体のさらに好ましい態様としては、例えば、下記（ホ）または（ヘ）のモノクローナル抗体が挙げられる。

（ホ） 前記（１）に記載のモノクローナル抗体における（d）乃至（g）のいずれかの性質を有するモノクローナル抗体。

（ヘ） 前記（４）乃至前記（７）のいずれかに記載されるモノクローナル抗体。

ト） 前記（１０）、前記（１４）乃至前記（２８）のいずれかに記載されるモノクローナル抗体。

本態様において、種々疾患の治療または予防、即ち医薬品としての適用の目的における使用においては、上記（ホ）乃至（ヘ）に記載のモノクローナル抗体に包含されるヒトモノクローナル抗体が好ましい。

本態様において、本願発明の別の主題である哺乳動物のCTGFの定量、検出、分離または精製の目的における使用においては、上記（ホ）乃至（ヘ）に記載のいずれのモノクローナル抗体をも使用し得る。

【0025】

本願発明のモノクローナル抗体の特に好ましい態様としては、例えば、下記（ト）または（チ）のモノクローナル抗体を挙げることができる。

（ト） 前記（二）乃至（ト）に記載のモノクローナル抗体。

（チ） 前記（１４）乃至（２６）または前記（２８）のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

本態様において、種々疾患の治療または予防、即ち医薬品としての適用の目的における使用においては、上記（チ）に記載のモノクローナル抗体が好ましい。

本態様において、本願発明の別の主題である哺乳動物のCTGFの定量、検出、分離または精製の目的における使用においては、上記（ト）乃至（チ）に記載のいずれのモノクローナル抗体をも使用し得る。

【0026】

本願発明のモノクローナル抗体のとりわけ好ましい態様としては、例えば、下記（リ）乃至（カ）のモノクローナル抗体を挙げることができる。

（リ） 前記（４）または（６）に記載のモノクローナル抗体。

（ヌ） 前記（１４）乃至前記（１６）のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

（ル） 前記（１７）に記載のモノクローナル抗体における（ａ）、（ｃ）、（ｅ）、（ｇ）または（ｉ）に記載の特徴を有するモノクローナル抗体。

（ヲ） 前記（１８）に記載のモノクローナル抗体における（ａ）、（ｃ）、（ｅ）、（ｇ）または（ｉ）に記載の特徴を有するモノクローナル抗体。

（ワ） 前記（１９）、前記（２１）、前記（２３）または前記（２５）のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

（カ） 前記（２８）に記載のモノクローナル抗体。

乃至（２６）または前記（２８）のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

本態様において、種々疾患の治療または予防、即ち医薬品としての適用の目的における使用においては、上記（ヌ）乃至（カ）のいずれかに記載のモノクローナル抗体が好ましい。

本態様において、本願発明の別の主題である哺乳動物のＣＴＧＦの定量、検出、分離または精製の目的における使用においては、上記（リ）乃至（カ）に記載のいずれのモノクローナル抗体をも使用し得るが、特には上記（リ）に記載のモノクローナル抗体が好ましい。

【0027】

本発明の「モノクローナル抗体」は、前記に定義した結合組織増殖因子（天然体、組換え体、合成物、細胞培養上清を含む）若しくはその一部を抗原（免疫源）として用い、マウス、ラット、ハムスター、モルモットあるいはウサギ等の哺乳動物に免疫して得られる天然型抗体、遺伝子組換え技術を用いて製造され得るキメラ抗体及びヒト型抗体（CDR-grafted抗体）、並びに例えば、ヒト抗体産生トランスジェニック動物等を用いて製造され得るヒトモノクローナル抗体も包含する。

さらには。後述する本発明の「組換えモノクローナル抗体を産生する細胞」から産生されるような、遺伝子組換えモノクローナル抗体も本発明のモノクローナル抗体に包含される。

またモノクローナル抗体の場合には、I g G、I g M、I g A (I g A1、I g A2)、I g DあるいはI g E等のいずれのアイソタイプを有するモノクローナル抗体をも包含する。好ましくは、I g G (I g G1、I g G2、I g G3、I g G4、好ましくはI g G2またはI g G4) またはI g Mであり、さらに好ましくはI g Gである。。

【0028】

本発明で言うポリクローナル抗体（抗血清）あるいはモノクローナル抗体は、既存の一般的な製造方法によって製造することができる。即ち、例えば、抗原を、必要に応じてフロイントアジュバント (Freund's Adjuvant) とともに、哺乳動物（後述するヒト抗体産生トランスジェニックマウスのような他の動物由来の抗体を産生するように作出されたトランスジェニック動物を含む）、好ましくは、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、ブタ、ヤギ、ウマあるいはウシ、より好ましくはマウス、ラット、ハムスター、モルモットまたはウサギに免疫する。ポリクローナル抗体は、該免疫感作動物から得た血清から取得することができる。またモノクローナル抗体は、該免疫感作動物から得た該抗体産生細胞と自己抗体産生能のない骨髓腫系細胞（ミエローマ細胞）から融合細胞（ハイブリドーマ）を調製し、該ハイブリドーマをクローン化し、哺乳動物の免疫に用いた抗原に対して特異的親和性を示すモノクローナル抗体を産生するクローンを選択することによって製造される。

また、後述する本発明の「組換えモノクローナル抗体を産生する細胞」によっても製造できる。

【0029】

モノクローナル抗体は、具体的には下記のようにして製造することができる。即ち、前述の結合組織増殖因子 (CTGF; 天然体、組換え体、合成物、細胞培養上清を含む) 若しくはその一部を免疫原として、該免疫原を、必要に応じてフロイントアジュバント (Freund's Adjuvant) とともに、非ヒト哺乳動物、具体的には、マウス、ラット、ハムスター、モルモットあるいはウサギ、好ましくは

マウス、ラットあるいはハムスター（後述するヒト抗体産生トランスジェニックマウスのような他の動物由来の抗体を産生するように作出されたトランスジェニック動物を含む）の皮下内、筋肉内、静脈内、フットパッド内あるいは腹腔内に1乃至数回注射するかあるいは移植することにより免疫感作を施す。通常、初回免疫から約1乃至14日毎に1乃至4回免疫を行って、最終免疫より約1乃至5日後に免疫感作された該哺乳動物から抗体産生細胞が取得される。免疫を施す回数及び時間的インターバルは、使用する免疫原の性質などにより、適宜変更することができる。

【0030】

モノクローナル抗体を分泌する融合細胞（ハイブリドーマ）の調製は、ケーラー及びミルシュタインらの方法（ネイチャー(Nature)、第256巻、第495～第497頁、1975年）及びそれに準じる修飾方法に従って行うことができる。即ち、前述の如く免疫感作された非ヒト哺乳動物から取得される脾臓、リンパ節、骨髓あるいは扁桃等、好ましくは脾臓に含まれる抗体産生細胞と、好ましくはマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギまたはヒト等の哺乳動物、より好ましくはマウス、ラットまたはヒト由来の自己抗体産生能のないミエローマ細胞との細胞融合させることにより調製される。

【0031】

細胞融合に用いられるミエローマ細胞としては、例えばマウス由来ミエローマP3/X63-Ag8.653 (ATCC No. CRL-1580)、P3/NSI/1-Ag4-1 (NS-1)、P3/X63-Ag8.U1 (P3U1)、SP2/0-Ag14 (Sp2/0, Sp2)、PA1、F0あるいはBW5147、ラット由来ミエローマ210RCY3-Ag.2.3.、ヒト由来ミエローマU-266AR1、GM1500-6TG-A1-2、UC729-6、CEM-AGR、DIR11あるいはCEM-T15を使用することができる。

モノクローナル抗体を産生する細胞（例えば、ハイブリドーマ）のスクリーニングは、該細胞を、例えばマイクロタイタープレート中で培養し、増殖の見られたウェルの培養上清の前述のマウス免疫感作で用いた免疫抗原に対する反応性を、例えばRIAやELISA等の酵素免疫測定法によって測定することにより行なうことができる。

【0032】

ハイブリドーマからのモノクローナル抗体の製造は、ハイブリドーマをインビトロ、またはマウス、ラット、モルモット、ハムスターまたはウサギ等、好ましくはマウスまたはラット、より好ましくはマウスの腹水中等でのインビボで行い、得られた培養上清、または哺乳動物の腹水から単離することにより行うことができる。

また、該ハイブリドーマあるいは後述する本発明の「組換えモノクローナル抗体を産生する細胞」からモノクローナル抗体をコードする遺伝子をクローニングし、トランスジェニック動物作製技術を用いて当該遺伝子が内在性遺伝子に組み込まれたトランスジェニックなウシ、ヤギ、ヒツジまたはブタを作製し、当該トランスジェニック動物のミルク中から当該抗体遺伝子に由来するモノクローナル抗体を大量に取得することも可能である（日系サイエンス、1997年4月号、第78頁乃至84頁）。

該細胞をインビトロで培養する場合には、培養する細胞種の特性、試験研究の目的及び培養方法等の種々条件に合わせて、ハイブリドーマを増殖、維持及び保存させ、培養上清中にモノクローナル抗体を産生させるために用いられるような既知栄養培地あるいは既知の基本培地から誘導調製されるあらゆる栄養培地を用いて実施することが可能である。

【0033】

基本培地としては、例えば、Ham' F12培地、MCDB153培地あるいは低カルシウムMEM培地等の低カルシウム培地及びMCDB104培地、MEM培地、D-MEM培地、RPMI1640培地、ASF104培地あるいはRD培地等の高カルシウム培地等が挙げられ、該基本培地は、目的に応じて、例えば血清、ホルモン、サイトカイン及び／または種々無機あるいは有機物質等を含むことができる。

モノクローナル抗体の単離、精製は、上述の培養上清あるいは腹水を、飽和硫酸アンモニウム、ユーグロブリン沈澱法、カプロイン酸法、カプリル酸法、イオン交換クロマトグラフィー（DEAEまたはDE52等）、抗イムノグロブリンカラムあるいはプロテインAカラム等のアフィニティカラムクロマトグラフィーに供すること等により行うことができる。

【0034】

本発明のモノクローナル抗体には、該抗体を構成する重鎖及び／または軽鎖の各々のアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有する重鎖及び／または軽鎖からなるモノクローナル抗体も包含されるが、ここで、「数個のアミノ酸」とは、複数個のアミノ酸を意味し、具体的には1乃至10個のアミノ酸であり、好ましくは1乃至5個のアミノ酸である。

本発明のモノクローナル抗体のアミノ酸配列中に、前記のようなアミノ酸の部分的改変（欠失、置換、挿入、付加）は、該アミノ酸配列をコードする塩基配列を部分的に改変することにより導入することができる。この塩基配列の部分的改変は、既知の部位特異的変異導入法（Site specific mutagenesis）を用いて常法により導入することができる（Proc. Natl. Acsd. Sci. USA, Vol.81, p.5662-5666, 1984）。

【0035】

本発明における「ヒトモノクローナル抗体」とは、前記に定義したような哺乳動物のCTGF（好ましくはヒトのCTGF）に反応性を有するヒトモノクローナル抗体である。例えば、後述の実施例及び図面に記載されるような様々な特性を有する各種のヒトモノクローナル抗体を挙げることができる。

具体的には、イムノグロブリンを構成する重鎖（H鎖）の可変領域（Variable region）及びH鎖の定常領域（Constant Region）並びに軽鎖（L鎖）の可変領域及びL鎖の定常領域を含む全ての領域がヒトイムノグロブリンをコードする遺伝子に由来するヒトイムノグロブリンである。L鎖としては、ヒトκ鎖またはヒトλ鎖が挙げられる。

【0036】

本発明のヒトモノクローナル抗体は、例えば、既報の方法に従って製造することができる「ヒト抗体を産生する能力を有するトランスジェニックマウス」に代表されるような「ヒト抗体を産生する能力を有するトランスジェニック非ヒト哺乳動物」を、前記に定義した哺乳動物のCTGFで免疫することによって製造することができる。当該非ヒト哺乳動物への免疫及び抗体産生融合細胞（ハイブリドーマ）の製造及びスクリーニング、並びに当該ヒトモノクローナル抗体の大量

調製は、前述の一般的な方法を用いて実施することができる（Nature Genetics, Vol.7, p.13-21, 1994；Nature Genetics, Vol.15, p.146-156, 1997；特表平4-504365号公報；特表平7-509137号公報；日経サイエンス、6月号、第40～第50頁、1995年；国際出願公開WO94/25585号公報；Nature, Vol.368, p.856-859, 1994；及び特表平6-500233号公報など）。

該ヒト抗体産生トランスジェニックマウスは、具体的には、例えば下記の工程からなる手法を用いることにより作製できる。他のヒト抗体産生トランスジェニック非ヒト哺乳動物も同様にして製造することができる。

【 0 0 3 7 】

(1) マウス内在性イムノグロブリン重鎖遺伝子座の少なくとも一部を相同組換えにより薬剤耐性マーカー遺伝子（ネオマイシン耐性遺伝子など）で置換することにより該マウス内在性イムノグロブリン重鎖遺伝子が機能的に不活性化されたノックアウトマウスを作製する工程。

(2) マウス内在性イムノグロブリン軽鎖遺伝子座の少なくとも一部を相同組換えにより薬剤耐性マーカー遺伝子（ネオマイシン耐性遺伝子など）で置換することにより該マウス内在性イムノグロブリン軽鎖遺伝子（特にκ鎖遺伝子）が機能的に不活性化されたノックアウトマウスを作製する工程。

(3) 酵母人工染色体 (Yeast artificial chromosome, YAC) ベクター等に代表されるような巨大遺伝子を運搬可能なベクターを用いて、ヒト免疫グロブリン重鎖遺伝子座の所望の領域がマウス染色体中に組み込まれたトランスジェニックマウスを作製する工程。

(4) YAC等に代表されるような巨大遺伝子を運搬可能なベクターを用いて、ヒト免疫グロブリン軽鎖（特に κ 鎖）遺伝子座の所望の領域がマウス染色体中に組み込まれたトランスジェニックマウスを作製する工程。

(5) 前記(1)乃至(4)のノックアウトマウス及びトランスジェニックマウスを任意の順序で交配することにより、マウス内在性免疫グロブリン重鎖遺伝子座及びマウス内在性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座がともに機能的に不活性化され、且つヒト免疫グロブリン重鎖遺伝子座の所望の領域及ヒト免疫グロブリン軽鎖遺伝子座の所望の領域がともにマウス染色体上に組み込まれたトランスジェニ

ックマウスを作製する工程。

【0038】

前記ノックアウトマウスは、マウス内在性イムノグロブリン遺伝子座の適当な領域を外来性マーカー遺伝子（ネオマイシン耐性遺伝子など）で相同組換えにより置換することにより該遺伝子座が再構成（リアレンジメント）できないように不活性化することにより作製できる。該相同組換えを用いた不活性化には、例えば、ポジティブ・ネガティブ・セレクション（Positive Negative Selection; P NS）と呼称される方法を用いることができる（日経サイエンス，5月号，p.52-62，1994）。

イムノグロブリン重鎖遺伝子座の機能的な不活性化には、例えば、J領域またはC領域（例えばC μ 領域）の一部に障害を導入することにより達成できる。またイムノグロブリン軽鎖（例えば κ 鎖）に機能的な不活性化は、例えば、J領域若しくはC領域の一部、またはJ領域及びC領域にまたがる領域を含む領域に障害を導入することにより達成可能である。

【0039】

トランスジェニックマウスは、トランスジェニック動物の製造において通常使用されるような常法（例えば、最新動物細胞実験マニュアル、エル・アイ・シー発行、第7章、第361～第408頁、1990年を参照）に従って作製することが可能である。具体的には、例えば、正常マウス胚盤胞（blastocyst）に由来するHPRT陰性（ヒポキサンチンゲアニン・フォスフォリボシルトランスフェラーゼ遺伝子を欠いている）ES細胞（embryonic stem cell）を、該ヒトイムノグロブリン重鎖遺伝子座または軽鎖遺伝子座をコードする遺伝子またはその一部並びにHPRT遺伝子が挿入されたYACベクターを含む酵母とスフェロプラスト融合法により融合する。該外来性遺伝子がマウス内在性遺伝子上にインテグレートされたES細胞をHATセレクション法により選別する。次いで、選別したES細胞を、別の正常マウスから取得した受精卵（胚盤胞）にマイクロインジェクションする（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.77, No.12, pp.7380-7384, 1980；米国特許第4,873,191号公報）。該胚盤胞を仮親としての別の正常マウスの子宮に移植する。そうして該仮親マウスから、キメラトランスジェニックマウスが生まれ

る。該キメラトランスジェニックマウスを正常マウスと交配させることによりヘテロトランスジェニックマウスを得る。該ヘテロ (heterogeneous) トランスジェニックマウス同士を交配することにより、メンデルの法則に従って、ホモ (homogeneous) トランスジェニックマウスが得られる。

【0040】

本発明における「キメラモノクローナル抗体」は、遺伝子工学的に作製されるモノクローナル抗体であって、具体的には、その可変領域が、非ヒト哺乳動物（マウス、ラット、ハムスターなど）のイムノグロブリン由来の可変領域であり、かつその定常領域がヒトイムノグロブリン由来の定常領域であることを特徴とするマウス／ヒトキメラモノクローナル抗体等のキメラモノクローナル抗体を意味する。

ヒトイムノグロブリン由来の定常領域は、IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4)、IgM、IgA、IgD及びIgE等のアイソタイプにより各々固有のアミノ酸配列を有するが、本発明における組換えキメラモノクローナル抗体の定常領域はいずれのアイソタイプに属するヒトイムノグロブリンの定常領域であってもよい。好ましくは、ヒトIgGの定常領域である。

【0041】

本発明におけるキメラモノクローナル抗体は、例えば以下のようにして製造することができる。しかしながら、そのような製造方法に限定されるものでないことは言うまでもない。

例えば、マウス／ヒトキメラモノクローナル抗体は、実験医学（臨時増刊号）、第1.6巻、第10号、1988年及び特公平3-73280号公報等を参照しながら作製することができる。即ち、マウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから単離した該マウスモノクローナル抗体をコードするDNAから取得した活性な V_H 遺伝子（H鎖可変領域をコードする再配列されたVDJ遺伝子）の下流に、ヒトイムノグロブリンをコードするDNAから取得した C_H 遺伝子（H鎖定常領域をコードするC遺伝子）を、また該ハイブリドーマから単離したマウスモノクローナル抗体をコードするDNAから取得した活性な V_L 遺伝子（L鎖可変領域をコードする再配列されたVJ遺伝子）の下流にヒトイムノグロ

ムリンをコードするDNAから取得したC_L遺伝子（L鎖定常領域をコードするC遺伝子）を、各々発現可能なように配列して1つ又は別々の発現ベクターに挿入し、該発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、該形質転換細胞を培養することにより作製することができる。

【0042】

具体的には、まず、マウスモノクローナル抗体産生ハイブリドーマから常法によりDNAを抽出後、該DNAを適切な制限酵素（例えばEcoRI、HindIII等）を用いて消化し、電気泳動に付して（例えば0.7%アガロースゲル使用）サザンブロット法を行う。泳動したゲルを例えばエチジウムブロマイド等で染色し、写真撮影後、マーカの位置を付し、ゲルを2回水洗し、0.25M HCl溶液に15分間浸す。次いで、0.4NのNaOH溶液に10分間浸し、その間緩やかに振盪する。常法により、フィルターに移し、4時間後フィルターを回収して2×SSCで2回洗浄する。フィルターを十分乾燥した後、ベイクン（75℃、3時間）を行う。ベイクン終了後に、該フィルターを0.1×SSC/0.1%SDS溶液に入れ、65℃で30分間処理する。次いで、3×SSC/0.1%SDS溶液に浸す。得られたフィルターをブレイブリダイゼーション液と共にビニール袋に入れ、65℃で3～4時間処理する。

【0043】

次に、この中に³²P標識したプローブDNA及びハイブリダイゼーション液を入れ、65℃で12時間程度反応させる。ハイブリダイゼーション終了後、適切な塩濃度、反応温度および時間（例えば、2×SSC-0.1%SDS溶液、室温、10分間）のもとで、フィルターを洗う。該フィルターをビニール袋に入れ、2×SSCを少量加え、密封し、オートラジオグラフィーを行う。

上記サザンブロット法により、マウスモノクローナル抗体のH鎖及びL鎖を各々コードする再配列されたVDJ遺伝子及びVJ遺伝子を同定する。同定したDNA断片を含む領域をショ糖密度勾配遠心にて分画し、ファージベクター（例えば、Charon 4A、Charon 28、λEMBL 3、λEMBL 4等）に組み込み、該ファージベクターで大腸菌（例えば、LE392、NM539等）を形質転換し、ゲノムライブラリーを作製する。そのゲノムライブラリーを適当なプローブ（H鎖J遺伝子

、L鎖(κ)J遺伝子等)を用いて、例えばベントンディビス法(サイエンス(Science)、第196巻、第180~第182頁、1977年)に従って、ブライクハイブリダイゼーションを行い、再配列されたVDJ遺伝子あるいはVJ遺伝子を各々含むポジティブクローンを得る。得られたクローンの制限酵素地図を作製し、塩基配列を決定し、目的とする再配列された V_H (VDJ)遺伝子あるいは V_L (VJ)遺伝子を含む遺伝子が得られていることを確認する。

【0044】

一方、キメラ化に用いるヒト C_H 遺伝子及びヒト C_L 遺伝子を別に単離する。例えば、ヒトIgG1とのキメラ抗体を作製する場合には、 C_H 遺伝子である $C\gamma_1$ 遺伝子と C_L 遺伝子である $C\kappa$ 遺伝子を単離する。これらの遺伝子はマウス免疫グロブリン遺伝子とヒト免疫グロブリン遺伝子の塩基配列の高い相同性を利用してヒト $C\gamma_1$ 遺伝子及びヒト $C\kappa$ 遺伝子に相当するマウス $C\gamma_1$ 遺伝子及びマウス $C\kappa$ 遺伝子をプローブとして用い、ヒトゲノムライブラリーから単離することによって得ることができる。

【0045】

具体的には、例えば、クローンIg146(プロシーディングスナショナルアカデミーオブサイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、第75巻、第4709~第4713頁、1978年)からの3kbのHindIII-BamHI断片とクローンMEP10(プロシーディングスナショナルアカデミーオブサイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、第78巻、第474~第478頁、1981年)からの6.8kbのEcoRI断片をプローブとして用い、ヒトのラムダCharon 4AのHaeIII-AluIゲノムライブラリー(セル(Cell)、第15巻、第1157~第1174頁、1978年)中から、ヒト $C\kappa$ 遺伝子を含み、エンハンサー領域を保持しているDNA断片を単離する。また、ヒト $C\gamma_1$ 遺伝子は、例えばヒト胎児肝細胞DNAをHindIIIで切断し、アガロースゲル電気泳動で分画した後、5.9Kbのバンドを λ 778に挿入し、前記のプローブを用いて単離する。

【0046】

このようにして単離されたマウス V_H 遺伝子とマウス V_L 遺伝子、及びヒト C_H 遺伝子とヒト C_L 遺伝子を用いて、プロモーター領域及びエンハンサー領域など

を考慮しながらマウス V_H 遺伝子の下流にヒト C_H 遺伝子を、またマウス V_L 遺伝子の下流にヒト C_L 遺伝子を、適切な制限酵素及びDNAリガーゼを用いて、例えばpSV2gptあるいはpSV2neo等の発現ベクターに常法に従って組み込む。この際、マウス V_H 遺伝子／ヒト C_H 遺伝子とマウス V_L 遺伝子／ヒト C_L 遺伝子のキメラ遺伝子は、一つの発現ベクターに同時に配置されてもよいし、各々別個の発現ベクターに配置することもできる。

【0047】

このようにして作製したキメラ遺伝子挿入発現ベクターを、例えばP3X63・Ag8・653細胞あるいはSP210細胞といった、自らは抗体を産生していない骨髓腫細胞にプロトプラスト融合法、DEAEーデキストラン法、リン酸カルシウム法あるいは電気穿孔法等により導入する。形質転換細胞は、発現ベクターに導入された薬物耐性遺伝子に対応する薬物含有培地中での培養により選別し、目的とするキメラモノクローナル抗体産生細胞を取得する。

このようにして選別された抗体産生細胞の培養上清中から目的のキメラモノクローナル抗体を取得する。

【0048】

本発明における「ヒト型モノクローナル抗体 (CDR-grafted抗体)」は、遺伝子工学的に作製されるモノクローナル抗体であって、具体的には、その超可変領域の相補性決定領域の一部または全部が非ヒト哺乳動物 (マウス、ラット、ハムスターなど) のモノクローナル抗体に由来する超可変領域の相補性決定領域であり、その可変領域の枠組領域がヒトイムノグロブリン由来の可変領域の枠組領域であり、かつその定常領域がヒトイムノグロブリン由来の定常領域であることを特徴とするヒト型モノクローナル抗体を意味する。

【0049】

ここで、超可変領域の相補性決定領域とは、抗体の可変領域中の超可変領域に存在し、抗原と相補的に直接結合する部位である3つの領域 (Complementarity-determining residue; CDR1、CDR2、CDR3) を指し、また可変領域の枠組領域とは、該3つ相補性決定領域の前後に介在する比較的保存された4つの領域 (Framework; FR1、FR2、FR3、FR4) を指す。

換言すれば、非ヒト哺乳動物由来のモノクローナル抗体の超可変領域の相補性決定領域の一部または全部以外の全ての領域が、ヒトイムノグロブリンの対応領域と置き代わったモノクローナル抗体を意味する。

ヒトイムノグロブリン由来の定常領域は、I g G (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4)、I g M、I g A、I g D 及び I g E 等のアイソタイプにより各々固有のアミノ酸配列を有するが、本発明におけるヒト型モノクローナル抗体の定常領域はいずれのアイソタイプに属するヒトイムノグロブリンの定常領域であってもよい。好ましくは、ヒト I g G の定常領域である。また、ヒトイムノグロブリン由来の可変領域の枠組領域についても限定されるものではない。

【0050】

本発明におけるヒト型モノクローナル抗体は、例えば以下のようにして製造することができる。しかしながら、そのような製造方法に限定されるものでないことは言うまでもない。

例えば、マウスモノクローナル抗体に由来する組換えヒト型モノクローナル抗体は、特表平4-506458号公報及び特開昭62-296890号公報等を参照して、遺伝子工学的に作製することができる。即ち、マウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから、少なくとも1つのマウスH鎖CDR遺伝子と該マウスH鎖CDR遺伝子に対応する少なくとも1つのマウスL鎖CDR遺伝子を単離し、またヒトイムノグロブリン遺伝子から前記マウスH鎖CDRに対応するヒトH鎖CDR以外の全領域をコードするヒトH鎖遺伝子と、前マウスL鎖CDRに対応するヒトL鎖CDR以外の全領域をコードするヒトL鎖遺伝子を単離する。

【0051】

単離した該マウスH鎖CDR遺伝子と該ヒトH鎖遺伝子を発現可能なように適当な発現ベクターに導入し、同様に該マウスL鎖CDR遺伝子と該ヒトL鎖遺伝子を発現可能なように適当なもう1つの発現ベクターに導入する。または、該マウスH鎖CDR遺伝子／ヒトH鎖遺伝子とマウスL鎖CDR遺伝子／ヒトL鎖遺伝子を同一の発現ベクターに発現可能なように導入することもできる。このようにして作製された発現ベクターで宿主細胞を形質転換することによりヒト型モノ

クローナル抗体産生形質転換細胞を得、該形質転換細胞を培養することにより培養上清中から目的のヒト型モノクローナル抗体を得る。

【0052】

本発明における「モノクローナル抗体」には、該モノクローナル抗体の「一部」も包含される。該「モノクローナル抗体の一部」とは、前述の本発明におけるモノクローナル抗体の一部分の領域を意味し、具体的には $F(ab')_2$ 、 Fab' 、 Fab 、 Fv (variable fragment of antibody)、 sFv 、 $dsFv$ (disulphide stabilised Fv) あるいは dAb (single domain antibody) である (エキスパート・オピニオン・オン・テラピューティック・パテント (Exp. Opin. Ther. Patents), 第6巻, 第5号, 第441~456頁, 1996年)。

【0053】

ここで、「 $F(ab')_2$ 」及び「 Fab' 」とは、イムノグロブリン (モノクローナル抗体) を、蛋白分解酵素であるペプシンあるいはパパイン等で処理することにより製造され、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の前後で消化されて生成される抗体フラグメントを意味する。例えば、 IgG をパパインで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の上流で切断されて V_L (L鎖可変領域) と C_L (L鎖定常領域) からなるL鎖、及び V_H (H鎖可変領域) と $C_H\gamma 1$ (H鎖定常領域中の $\gamma 1$ 領域) とからなるH鎖フラグメントがC末端領域でジスルフィド結合により結合した相同な2つの抗体フラグメントを製造することができる。これら2つの相同な抗体フラグメントを各々 Fab' という。また IgG をペプシンで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の下流で切断されて前記2つの Fab' がヒンジ領域でつながったものよりやや大きい抗体フラグメントを製造することができる。この抗体フラグメントを $F(ab')_2$ という。

【0054】

本発明の「モノクローナル抗体を産生する細胞」あるいは「組換えモノクローナル抗体を産生する細胞」とは、前述した本発明のモノクローナル抗体を産生する任意の細胞を意味する。具体的には、例えば、下記(1)乃至(3)のいずれかに記載される細胞を挙げることができる。

(1) 前記で定義した哺乳動物のCTGF（好ましくはヒトのCTGF）若しくはその一部または該CTGFを分泌する細胞等で、前述のヒト以外の哺乳動物または前述のヒト抗体を産生する能力を有するトランスジェニックマウス（若しくは他のトランスジェニック非ヒト哺乳動物）を免疫することにより得られ、該CTGFに反応性を有するモノクローナル抗体を産生する該動物から採取され得るモノクローナル抗体産生B細胞。

(2) そのようにして得られた抗体産生B細胞を哺乳動物由来のミエローマ細胞と細胞融合して得られる前述の融合細胞（ハイブリドーマ）。

(3) 該モノクローナル抗体産生B細胞またはモノクローナル抗体産生融合細胞（ハイブリドーマ）から単離される該モノクローナル抗体をコードする遺伝子（重鎖をコードする遺伝子若しくは軽鎖をコードする遺伝子のいずれか一方、または両方の遺伝子）で、該B細胞及びハイブリドーマ以外の細胞（例えば、CHO（Chinese hamster ovarian）細胞）、BHK（Baby hamster kidney）細胞などを形質転換して得られるモノクローナル抗体産生形質転換細胞（遺伝子組換え細胞）。

ここで、前記（3）に記載のモノクローナル抗体産生形質転換細胞（遺伝子組換え細胞）は、即ち、前記（1）のB細胞または（2）のハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体の遺伝子組換え体を産生する遺伝子組換え細胞を意味する。これらの抗体産生形質転換細胞は、前述のキメラモノクローナル抗体及びヒト型モノクローナル抗体の製造において用いられる一般的遺伝子組換え技術を用いて製造することができる。

【0055】

本発明における「実質的に同一の性質を有するモノクローナル抗体」とは、当該モノクローナル抗体の生物学的性質が、他のモノクローナル抗体の生物学的性質と比較した場合に、少なくとも下記の点で有意な差を有しないことを意味する。

(1) 当該モノクローナル抗体を作製するために、非ヒト哺乳動物の免疫に用いた特定の動物由来のCTGFに対する反応性。

(2) 当該特定の動物種のCTGFに対応する他の動物種のCTGFに対する反

応性（所謂、交叉反応性）。

（３）後述の実施例に記載される種々の試験により求められる特性。

【0056】

本発明における「哺乳動物由来の抗血清」とは、該本発明のモノクローナル抗体またはその一部に反応性を有する抗体を含む血清を意味する。該抗血清は、例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヤギ、ブタあるいはウシ等の哺乳動物、好ましくはラット、モルモット、ウサギあるいはヤギに、前記本発明のモノクローナル抗体あるいはその一部を、前述モノクローナル抗体の製造方法で述べたような方法で免疫して製造することができる。

【0057】

本発明における「不溶性担体」とは、本発明のモノクローナル抗体若しくはその一部（抗体フラグメント）、または試料（例えば、血漿等の体液試料、培養上清あるいは遠心上清等）中に含まれるCTGFを物理学的吸着あるいは化学的結合等によって担持させるための支持体を意味する。

例えば、下記（Ａ）並びに（Ｂ）などを挙げることができる。

（Ａ）ポリスチレン樹脂、ポリカーボネート樹脂、シリコン樹脂あるいはナイロン樹脂等からなるプラスチックや、ガラス等に代表されるような水に不溶性の物質からなるプレート、試験管若しくはチューブ等の内容積を有するもの、ビーズ（特には、マイクロビーズ）、ボール、フィルター、あるいはメンブレン等。

（Ｂ）セルロース系担体、アガロース系担体、ポリアクリルアミド系担体、デキストラン系担体、ポリスチレン系担体、ポリビニルアルコール系担体、ポリアミノ酸系担体あるいは多孔性シリカ系担体等のようなアフィニティークロマトグラフィーに用いられる不溶性担体を挙げるすることができる。

【0058】

本発明の「抗体固定化不溶性担体」とは、前記のような不溶性担体上に、本発明のモノクローナル抗体（または該抗体の一部、即ち抗体フラグメント）が、物理的吸着あるいは化学的結合等によって担持された状態にある不溶性担体を意味する。これらの抗体固定化不溶性担体は、試料（例えば、血清や血漿等の体液試料、培養上清あるいは遠心上清等）中に含まれるCTGFを検出、定量、分離ま

たは精製するために用いることができる。

該検出または定量の目的においては、前記（A）に例示した不溶性担体を用いることができ、とりわけ定量に用いる不溶性担体としては、操作の簡便性及び多数検体の同時処理の観点を考慮すると、例えば96穴マイクロタイタープレートあるいは48穴マイクロタイタープレート等の多数のウェル（Well、穴）を有するプラスチック等で作製されたマルチウェルマイクロタイタープレートを用いるのが好ましい。また、該分離または精製の目的においては、前記（A）に例示したフィルター若しくはメンブレンまたは前記（B）に例示した不溶性担体を用いることができる。

【0059】

本発明における「単独でまたは他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質」とは、それらを、前述のようなモノクローナル抗体若しくはその一部（抗体フラグメント）、あるいはCTGFの標準物質に物理化学的結合等により結合させることによりそれらの存在を検出可能にするために用いられる物質を意味する。

具体的には、酵素、蛍光物質、化学発光物質、ビオチン、アビジンあるいは放射性同位体等であり、さらに具体的には、ペルオキシダーゼ（例えば、horseradish peroxidase）、アルカリフォスファターゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、アルコール脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素、ペニシリナーゼ、カタラーゼ、アポグルコースオキシダーゼ、ウレアーゼ、ルシフェラーゼ若しくはアセチルコリンエステラーゼ等の酵素、フルオレスセインイソチオシアネート、フィコビリタンバク、希土類金属キレート、ダンシルクロライド若しくはテトラメチルローダミンイソチオシアネート等の蛍光物質、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{125}I 若しくは ^{131}I 等の放射性同位体、ビオチン、アビジン、または化学発光物質が挙げられる。

【0060】

ここで、放射性同位体及び蛍光物質は、単独で検出可能なシグナルをもたらすことができる。一方、酵素、化学発光物質、ビオチン及びアビジンは、単独では検出可能なシグナルをもたらすことができないため、さらに1種以上の他の物質

と反応することにより検出可能なシグナルをもたらす。例えば、酵素の場合には少なくとも基質が必要であり、酵素活性を測定する方法（比色法、蛍光法、生物発光法あるいは化学発光法等）に依存して種々の基質が用いられる。例えば、ペルオキシダーゼの場合には、基質として過酸化水素を用いる。また、ビオチンの場合には少なくともアビジンあるいは酵素修飾アビジンを反応させるのが一般的であるが、この限りではない。必要に応じてさらに該基質に依存する種々の発色物質が用いられる。

【0061】

本発明における「標識抗体」及び「標識された哺乳動物のCTGFの標準物質」とは、各々前記のような種々標準物質で標識されたモノクローナル抗体（または抗体フラグメント）及びCTGFを意味する。これらの標識抗体及び標識標準物質は、試料（例えば、血清や血漿等の体液試料、培養上清あるいは遠心上清等）中に含まれるCTGFを検出、定量、分離または精製するために用いることができる。本発明においては、上記のいずれの標識物質をも使用可能であるが、検出感度あるいは定量感度の高さ及び操作の利便性の点を考慮すると、ペルオキシダーゼ等の酵素あるいはビオチンで標識するのが好ましい。

【0062】

ここで「CTGFの標準物質」とは、試料中に含まれる濃度（含量）未知のCTGFと対照的に、あらかじめ単離されているCTGFを意味し、アッセイの目的に応じて自由にその濃度をコントロールすることができる標品（スタンダード）を意味する。該標準物質は、例えば、検量線の作成に用いることができる。

【0063】

本発明における「イムノアッセイ」とは、抗原抗体反応の原理に基づき、試料（例えば、血漿等の体液試料、培養上清あるいは遠心上清等）中に含まれる抗原の検出あるいは定量を行う方法を意味し、本発明においては、該抗原抗体反応における抗体が、本発明の哺乳動物のCTGFに反応性を有する前記のようなモノクローナル抗体（若しくはその抗体のフラグメント）、前記のような抗体固定化不溶性担体（若しくは抗体フラグメント固定化不溶性担体）、または前記のような標識抗体（若しくは標識抗体フラグメント）から選ばれる一つ以上の該モノク

ローナル抗体（または抗体フラグメント）をであること、及び抗原が哺乳動物の C T G F であること以外は、これまでに知られているイムノアッセイをも適用することができる。

【0064】

具体的には、酵素免疫測定法（第3版、石川榮治ら編集、医学書院発行、1987年）に記載されているような、例えば、一抗体固相法、二抗体液相法、二抗体固相法、サンドイッチ法、E M I T 法（Enzyme multiplied immunoassay technique）、エンザイムチャネリングアッセイ（Enzyme channeling immunoassay）、酵素活性修飾物質標識イムノアッセイ（Enzyme modulator mediated enzyme immunoassay、E M M I A）、酵素阻害物質標識イムノアッセイ（Enzyme inhibitor immunoassay）、イムノエンザイムメトリックアッセイ（Immunoenzymometric assay）、酵素活性増強イムノアッセイ（Enzyme enhanced immunoassay）あるいはプロキシマルリンケージイムノアッセイ（Proximal linkage immunoassay）等、さらには、特公平2-39747号公報に記載されているようなワンポット法を挙げることができる。

【0065】

本発明においては、このようなイムノアッセイを、目的に応じて適宜選択して用いることができるが、操作上の簡便性及び／または経済的な利便性、とりわけ臨床上での汎用性の点を考慮すると、サンドイッチ法、ワンポット法、一抗体固相法または二抗体液相法を用いるのが好ましく、より好ましくは、サンドイッチ法またはワンポット法である。特に好ましくは、本発明のモノクローナル抗体を、96穴マイクロプレートに代表されるような多数のウェルを有するマルチウェルマイクロプレートに固定化した抗体固定化不溶性担体と、酵素あるいはビオチンにより標識された標識抗体とを用いるサンドイッチ法、あるいは本発明のモノクローナル抗体を、マイクロビーズ等のビーズまたは微小なボールに固定化した抗体固定化不溶性担体と、酵素あるいはビオチンにより標識された標識抗体とを用いるワンポット法である。

【0066】

特に好ましい態様において具体的な一例を挙げるならば、図1に記載のモノク

ローナル抗体である「8-64-6」または「13-51-2」をマイクロプレートまたはマイクロビーズに固定化した抗体固定化不溶性担体と、図1に記載されるモノクローナル抗体である「8-86-2」を酵素またはビオチンで標識した標識抗体との組合わせによるサンドイッチ法またはワンポット法である。

「8-64-6」を固定化した抗体固定化不溶性担体と、「8-86-2」を酵素またはビオチンで標識した標識抗体との組合わせによるイムノアッセイでは、ヒト及びマウスのCTGFを高感度で検出、定量することができる。また、「13-51-2」を固定化した抗体固定化不溶性担体と、「8-86-2」を酵素またはビオチンで標識した標識抗体との組合わせによるイムノアッセイでは、ラット（本願において初めて開示される）及びマウスのCTGFを高感度で検出、定量することができる。

【0067】

以下に、サンドイッチ法、ワンポット法、一抗体固相法及び二抗体液相法について詳述する。

サンドイッチ法は、前述の本発明の前記（50）で述べた方法、即ち、少なくとも下記（a）及び（b）の工程を含むイムノアッセイ法である。

（a）本発明の抗体固定化不溶性担体に、試料を反応せしめる工程；及び

（b）該抗体固定化不溶性担体と該試料中に含まれる哺乳動物のCTGFとの結合により形成される抗原抗体複合体に、本発明の標識抗体を反応せしめる工程。

【0068】

本発明に即して、「抗体固定化不溶性担体」として図1に記載のモノクローナル抗体「8-64-6」をマイクロプレートに固定化した「抗体固定化マイクロプレート」を用い、また「標識抗体」として図1に記載のモノクローナル抗体「8-86-2」をペルオキシダーゼ等の酵素あるいはビオチンで標識した「標識抗体」を用いて、ヒトまたはマウスのCTGFを定量する方法について具体的に説明すると、例えば下記のような工程により構成されるが、該具体例のみに限定されるものではない。

また、「抗体固定化不溶性担体」として図1に記載のモノクローナル抗体「13-51-2」をマイクロプレートに固定化した「抗体固定化マイクロプレート」を用

い、また「標識抗体」として図 1 に記載のモノクローナル抗体「8-86-2」をペルオキシダーゼ等の酵素あるいはビオチンで標識した「標識抗体」を用いて下記と同様に操作することによって、マウスの CTGF だけでなくラット（本願において初めて開示される）の CTGF も定量することができる。

【0069】

（工程 1）本発明のモノクローナル抗体「8-64-6」をマイクロプレートに固定化し、抗体固定化マイクロプレートを作製する工程；

（工程 2）該抗体固定化マイクロプレートにヒトまたはマウスの血清等の試料を加え、該マイクロプレート上に固定化されているモノクローナル抗体と試料とを反応させる工程；

（工程 3）該マイクロプレートを洗浄し未反応の試料を該マイクロプレートから取り除く工程；

（工程 4）本発明のモノクローナル抗体「8-86-2」をビオチンあるいはペルオキシダーゼ等の酵素により標識し、標識抗体を作製する工程；

（工程 5）工程 3 で洗浄されたマイクロプレートに、該標識抗体を加え、該マイクロプレート上に固定化されたモノクローナル抗体と試料中に含まれるヒトまたはマウスの CTGF とが反応して形成される抗原抗体複合体に該標識抗体を反応させる工程；

【0070】

（工程 6）マイクロプレートを洗浄し、未反応の標識抗体を、該マイクロプレートから取り除く工程；

（工程 7）工程 6 で洗浄されたマイクロプレートに、必要に応じて発色物質と共に、用いた酵素の種類に依存して種々の基質（但し、工程 5 でペルオキシダーゼ等の酵素で標識した標識抗体を用いた場合）またはアビジンあるいは酵素修飾アビジン（但し、工程 5 でビオチンで標識した標識抗体を用いた場合）を加え、該基質、アビジンまたは酵素修飾アビジンと標識抗体上の標識物質とを反応させる工程；

（工程 8）工程 7 で酵素修飾アビジンを加えた場合には、該修飾に用いた酵素の種類に依存して種々の基質を加え、アビジンに結合した酵素と基質を反応させる

工程；

(工程9) マイクロプレートに反応停止液を加え、酵素反応及び発色反応を停止させる工程；及び

(工程10) 比色強度、蛍光強度あるいは発光強度を測定する工程。

【0071】

ワンポット法は、前述の本発明の(50)、(51)または(52)で各々述べた方法である。

即ち、第1は、少なくとも下記(a)及び(b)の工程を含むイムノアッセイ法である。

(a) 本発明の抗体固定化不溶性担体に、試料を反応せしめる工程；及び

(b) 該抗体固定化不溶性担体と該試料中に含まれる哺乳動物のCTGFとの結合により形成される抗原抗体複合体に、本発明の標識抗体を反応せしめる工程。

【0072】

第2は、少なくとも下記(a)及び(b)の工程を含むイムノアッセイ法である。

(a) 本発明の標識抗体と、試料を反応せしめる工程；及び

(b) 該標識抗体と試料中に含まれる哺乳動物のCTGFとの結合により形成される抗原抗体複合体に、本発明の抗体固定化不溶性担体を反応せしめる工程。

【0073】

第3は、少なくとも下記(a)の工程を含むイムノアッセイ法である。

(a) 本発明の抗体固定化不溶性担体、本発明の標識抗体、及び試料を含む混合物を反応せしめる工程。

本発明に即して、「抗体固定化不溶性担体」として図1に記載のモノクローナル抗体「8-64-6」をマイクロビーズに固定化した「抗体固定化マイクロビーズ」を用い、また「標識抗体」として図1に記載のモノクローナル抗体「8-86-2」をペルオキシダーゼ等の酵素あるいはビオチンで標識した「標識抗体」を用いて、ヒトまたはマウスのCTGFを定量する方法について具体的に説明すると、例え

ば下記のような工程により構成されるが、該具体例のみに限定されるものではない。

【0074】

また、「抗体固定化不溶性担体」として図1に記載のモノクローナル抗体「13-51-2」をマイクロビーズに固定化した「抗体固定化マイクロビーズ」を用い、また「標識抗体」として図1に記載のモノクローナル抗体「8-86-2」をペルオキシダーゼ等の酵素あるいはビオチンで標識した「標識抗体」を用いて下記と同様に操作することによって、マウスのCTGFだけでなくラット（本願において初めて開示される）のCTGFも定量することができる。

【0075】

第1の方法は、下記のような工程から構成される。

（工程1）本発明のモノクローナル抗体「8-64-6」をマイクロビーズに固定化し、抗体固定化マイクロビーズを作製する工程；

（工程2）試験管、マイクロプレートあるいはチューブ等のような内容積を有する容器に緩衝液とともに該抗体固定化マイクロビーズとヒトまたはマウスの血清等の試料を加え、該マイクロビーズ上に固定化されたモノクローナル抗体と試料とを反応させる工程；

（工程3）容器中の内溶液を除去し、ビーズを洗浄する工程；

（工程4）本発明のモノクローナル抗体「8-86-2」をビオチンあるいはペルオキシダーゼ等の酵素により標識し、標識抗体を作製する工程；

（工程5）工程3で洗浄されたビーズを含有する容器に該標識抗体を加え、該ビーズ上に固定化されたモノクローナル抗体と試料中に含まれるヒトまたはマウスのCTGFとが反応して形成される抗原抗体複合体に該標識抗体を反応させる工程；

【0076】

（工程6）容器中の内溶液の除去し、ビーズを洗浄することにより、未反応の標識抗体を取り除く工程；

（工程7）工程6で洗浄されたビーズを含む容器に、必要に応じて発色物質と共に、用いた酵素の種類に依存して種々の基質（但し、工程5でペルオキシダーゼ

等の酵素で標識した標識抗体を用いた場合) またはアビジンあるいは酵素修飾アビジン (但し、工程 5 でビオチンで標識した標識抗体を用いた場合) を加え、該基質、アビジンまたは酵素修飾アビジンと標識抗体上の標識物質とを反応させる工程;

(工程 8) 工程 7 で酵素修飾アビジンを加えた場合には、該修飾に用いた酵素の種類に依存して種々の基質を加え、アビジンに結合した酵素と基質を反応させる工程;

(工程 9) 工程 7 または工程 8 の反応系に反応停止液を加え、酵素反応及び発色反応を停止させる工程; 及び

(工程 10) 比色強度、蛍光強度あるいは発光強度を測定する工程。

【0077】

第 2 の方法は、下記のような工程から構成される。

(工程 1) 本発明のモノクローナル抗体「8-86-2」をビオチンあるいはペルオキシダーゼ等の酵素により標識し、標識抗体を作製する工程;

(工程 2) 試験管、マイクロプレートあるいはチューブ等のような内容積を有する容器に緩衝液とともに該標識抗体とヒトまたはマウスの血清等の試料を加え、該標識抗体と試料とを反応させる工程;

(工程 3) 本発明のモノクローナル抗体「8-64-6」をマイクロビーズに固定化し、抗体固定化マイクロビーズを作製する工程;

(工程 4) 工程 2 の反応系に、該ビーズを加え、標識抗体と試料中に含まれるヒトまたはマウスの CTGF とが反応して形成される抗原抗体複合体と、該ビーズ上に固定化されたモノクローナル抗体とを反応させる工程;

(工程 5) 容器中の内溶液の除去し、ビーズを洗浄することにより、未反応の標識抗体を取り除く工程;

【0078】

(工程 6) 工程 5 で洗浄されたビーズを含む容器に、必要に応じて発色物質と共に、用いた酵素の種類に依存して種々の基質 (但し、工程 2 でペルオキシダーゼ等の酵素で標識した標識抗体を用いた場合) またはアビジンあるいは酵素修飾アビジン (但し、工程 2 でビオチンで標識した標識抗体を用いた場合) を加え、該

基質、アビジンまたは酵素修飾アビジンと標識抗体上の標識物質とを反応させる工程；

(工程 7) 工程 6 で酵素修飾アビジンを加えた場合には、該修飾に用いた酵素の種類に依存して種々の基質を加え、アビジンに結合した酵素と基質を反応させる工程；

(工程 8) 工程 6 または工程 7 の反応系に反応停止液を加え、酵素反応及び発色反応を停止させる工程；及び

(工程 9) 比色強度、蛍光強度あるいは発光強度を測定する工程。

【0079】

第 3 の方法は、下記のような工程から構成される。

(工程 1) 本発明のモノクローナル抗体「8-64-6」をマイクロビーズに固定化し、抗体固定化マイクロビーズを作製する工程；

(工程 2) 本発明のモノクローナル抗体「8-86-2」をビオチンあるいはペルオキシダーゼ等の酵素により標識し、標識抗体を作製する工程；

(工程 3) 試験管、プレートあるいはチューブ等のような内容積を有する容器に緩衝液とともに、工程 1 で作製された抗体固定化マイクロビーズ、工程 2 で作製された標識抗体、及びヒトまたはマウスの血清等の試料を加え、該ビーズ上に固定化されたモノクローナル抗体、標識抗体、及び試料を同時に反応させる工程；

(工程 4) 容器中の内溶液を除去し、該ビーズを洗浄することにより、未反応の標識抗体を取り除く工程；

【0080】

(工程 5) 工程 4 で洗浄されたビーズを含む容器に、必要に応じて発色物質と共に、用いた酵素の種類に依存して種々の基質（但し、工程 3 でペルオキシダーゼ等の酵素で標識した標識抗体を用いた場合）またはアビジンあるいは酵素修飾アビジン（但し、工程 3 でビオチンで標識した標識抗体を用いた場合）を加え、該基質、アビジンまたは酵素修飾アビジンと標識抗体上の標識物質とを反応させる工程；

(工程 6) 工程 5 で酵素修飾アビジンを加えた場合には、該修飾に用いた酵素の種類に依存して種々の基質を加え、アビジンに結合した酵素と基質を反応させる

工程；

(工程7) 工程5または工程6の反応系に反応停止液を加え、酵素反応及び発色反応を停止させる工程；及び

(工程8) 比色強度、蛍光強度あるいは発光強度を測定する工程。

【0081】

一抗体固相法は、前述の本発明の(53)で述べた方法、即ち、少なくとも下記(a)の工程を含むイムノアッセイ法である。

(a) 本発明の抗体固定化不溶性担体に、試料、並びに単独でまたは他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質で標識された哺乳動物のCTGFの標準物質を反応せしめる工程。

【0082】

本発明に即して、「抗体固定化不溶性担体」として図1に記載のモノクローナル抗体「8-64-6」をマイクロプレートに固定化した「抗体固定化マイクロプレート」を用い、また「標識物質」として、特に一般的であるペルオキシダーゼ等の酵素あるいはビオチンを用いて、ヒトまたはマウスのCTGFを定量する方法について具体的に説明すると、例えば下記のような工程により構成されるが、該具体例のみに限定されるものではない。

また、「抗体固定化不溶性担体」として図1に記載のモノクローナル抗体「13-51-2」をマイクロプレートに固定化した「抗体固定化マイクロプレート」を用い、また「標識物質」として、特に一般的であるペルオキシダーゼ等の酵素あるいはビオチンを用いて下記と同様に操作することによって、マウスのCTGFだけでなくラット（本願において初めて開示される）のCTGFも定量することができる。

【0083】

(工程1) 本発明のモノクローナル抗体「8-64-6」をマイクロプレートに固定化し、抗体固定化マイクロプレートを作製する工程；

(工程2) ヒトまたはマウスのCTGFの標準物質をビオチンあるいはペルオキシダーゼ等の酵素により標識し、標識CTGF標準物質を作製する工程；

(工程3) 該マイクロプレートにヒトまたはマウスの血清等の試料及び該標識C

TGF 標準物質を加え、該試料と標識標準物質とを、該マイクロプレート上に固定化されたモノクローナル抗体と競合的に反応させる工程；

(工程 4) マイクロプレートを洗浄し、未反応の標識標準物質を、マイクロプレートから取り除く工程；

【0084】

(工程 5) 工程 4 で洗浄されたマイクロプレートに、必要に応じて発色物質と共に、用いた酵素の種類に依存して種々の基質（但し、工程 3 でペルオキシダーゼ等の酵素で標識した標識標準物質を用いた場合）またはアビジンあるいは酵素修飾アビジン（但し、工程 3 でビオチンで標識した標識標準物質を用いた場合）を加え、該基質、アビジンまたは酵素修飾アビジンと標識標準物質上の標識物質とを反応させる工程；

(工程 6) 工程 5 で酵素修飾アビジンを加えた場合には、該修飾に用いた酵素の種類に依存して種々の基質を加え、アビジンに結合した酵素と基質を反応させる工程；

(工程 7) マイクロプレートに反応停止液を加え、酵素反応及び発色反応を停止させる工程；及び

(工程 8) 比色強度、蛍光強度あるいは発光強度を測定する工程。

【0085】

二抗体液相法は、前述の本発明の (54) 及び (55) に記載した方法である。

即ち、第一は、少なくとも下記 (a) 及び (b) の工程を含むイムノアッセイ法である。

(a) 試料、並びに単独でまたは他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質で標識された哺乳動物の CTGF の標準物質との混合物に、本発明のモノクローナル抗体を反応せしめる工程；及び

(b) 該試料中に含まれる哺乳動物の CTGF 若しくは該標識された哺乳動物の CTGF の標準物質と、該モノクローナル抗体との結合により形成される抗原抗体複合体に、該モノクローナル抗体に反応性を有する哺乳動物由来の抗血清を反応せしめる工程。

【0086】

第2は、少なくとも下記（a）乃至（c）の工程を含むイムノアッセイ法である。

（a）試料に、本発明のモノクローナル抗体を反応せしめる工程；

（b）（a）の工程を行った反応系に、単独でまたは他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質で標識された哺乳動物のCTGFの標準物質を反応せしめる工程；及び

（c）該試料中に含まれる哺乳動物のCTGF若しくは該標識された哺乳動物のCTGFの標準物質と、該モノクローナル抗体との結合により形成される抗原抗体複合体に、該モノクローナル抗体に反応性を有する哺乳動物由来の抗血清を反応せしめる工程。

【0087】

本発明に即して、「モノクローナル抗体」として図1に記載のモノクローナル抗体「8-64-6」または「8-86-2」を用い、また「標識物質」として、特に一般的であるペルオキシダーゼ等の酵素またはビオチンを用いて、ヒトまたはマウスのCTGFを定量する方法について具体的に説明すると、例えば下記のような工程により構成されるが、該具体例のみに限定されるものではない。

また、「モノクローナル抗体」として図1に記載のモノクローナル抗体「13-51-2」を用い、また「標識物質」としてペルオキシダーゼ等の酵素またはビオチンを用いて下記と同様に操作することによって、マウスのCTGFだけでなくラット（本願において初めて開示される）のCTGFも定量することができる。

【0088】

第1の方法は、下記のような工程から構成される。

（工程1）ヒトまたはマウスのCTGFの標準物質をビオチンあるいはペルオキシダーゼ等の酵素により標識し、標識CTGF標準物質を作製する工程；

（工程2）試験管、プレートあるいはチューブ等のような内容積を有する容器に、マウスまたはヒトの血清等の試料と工程1で作製された標識CTGF標準物質との混合物を加え、次いで本発明のモノクローナル抗体「8-64-6」または「8-86-2」を加え、該試料と標識CTGF標準物質とを競合的に該モノクローナル抗体

と反応させる工程；

(工程3) ヤギ抗マウスγグロブリン血清等のようなマウス由来のモノクローナル抗体に反応性を有するマウス以外の動物由来の抗血清を加え、工程2において形成される試料中に含まれる哺乳動物CTGF若しくは標識CTGF標準物質と該モノクローナル抗体との抗原抗体複合体に該抗血清を反応させ、該複合体と抗血清とからなる複合凝集物を凝集沈殿させる工程；

(工程4) 工程3の反応系を遠心分離して凝集沈殿した複合体を分離する工程；

【0089】

(工程5) 工程4で分離された複合凝集物に、必要に応じて発色物質と共に、用いた酵素の種類に依存して種々の基質(但し、工程2でペルオキシダーゼ等の酵素で標識した標識標準物質を用いた場合)またはアビジンあるいは酵素修飾アビジン(但し、工程2でビオチンで標識した標識標準物質を用いた場合)を加え、該基質、アビジンまたは酵素修飾アビジンと標識標準物質上の標識物質とを反応させる工程；

(工程6) 工程5で酵素修飾アビジンを加えた場合には、該修飾に用いた酵素の種類に依存して種々の基質を加え、アビジンに結合した酵素と基質を反応させる工程；

(工程7) 工程5乃至工程6の反応系に反応停止液を加え、酵素反応及び発色反応を停止させる工程；及び

(工程8) 比色強度、蛍光強度あるいは発光強度を測定する工程。

【0090】

第2の方法は、下記のような工程から構成される。

(工程1) ヒトまたはマウスのCTGFの標準物質をビオチンあるいはペルオキシダーゼ等の酵素により標識し、標識CTGF標準物質を作製する工程；

(工程2) 試験管、プレートあるいはチューブ等のような内容積を有する容器にヒトまたはマウスの血清等の試料を加え、次いで本発明のモノクローナル抗体「8-64-6」または「8-86-2」を加え、該試料と該モノクローナル抗体とを反応させる工程；

(工程3) 工程2の反応系に、工程1で作製した標識CTGF標準物質を加え、

該標識CTGF標準物質と、工程2で試料と未反応であった残余のモノクローナル抗体とを反応させる工程；

(工程4) ヤギ抗マウスγグロブリン血清等のようなマウス由来のモノクローナル抗体に反応性を有するマウス以外の動物由来の抗血清を加え、工程2において形成される試料中に含まれる哺乳動物CTGFと該モノクローナル抗体との抗原抗体複合体、及び／または工程3において形成される標識CTGF標準物質と該モノクローナル抗体との抗原抗体複合体に、該抗血清を反応させ、該複合体と抗血清とからなる複合凝集物を凝集沈殿させる工程；

(工程5) 工程4の反応系を遠心分離して凝集沈殿した複合体を分離する工程；

【0091】

(工程6) 工程5で分離された複合凝集物に、必要に応じて発色物質と共に、用いた酵素の種類に依存して種々の基質（但し、工程3でペルオキシダーゼ等の酵素で標識した標識標準物質を用いた場合）またはアビジンあるいは酵素修飾アビジン（但し、工程3でビオチンで標識した標識標準物質を用いた場合）を加え、該基質、アビジンまたは酵素修飾アビジンと標識標準物質上の標識物質とを反応させる工程；

(工程7) 工程6で酵素修飾アビジンを加えた場合には、該修飾に用いた酵素の種類に依存して種々の基質を加え、アビジンに結合した酵素と基質を反応させる工程；

(工程8) 工程6乃至工程7の反応系に反応停止液を加え、酵素反応及び発色反応を停止させる工程；及び

(工程9) 比色強度、蛍光強度あるいは発光強度を測定する工程。

【0092】

本発明における「アフィニティークロマトグラフィー」とは、抗原と抗体、酵素と基質、あるいは受容体とリガンドといった物質間の相互作用（親和性）を利用することにより試料（例えば、血清及び血漿等の体液試料、培養上清あるいは遠心上清等）中に含まれる目的物質を分離または精製する方法を意味する。

本発明の方法は、抗原抗体反応、即ち、抗原としての哺乳動物のCTGFと、哺乳動物のCTGFに反応性を有する本発明のモノクローナル抗体との親和

性を利用することにより、試料（例えば、血清及び血漿等の体液試料、培養上清あるいは遠心上清等）中に含まれるCTGFを分離または精製する方法を意味する。

【0093】

具体的には、（１）前述のような不溶性担体であるフィルターあるいはメンブレン等に哺乳動物のCTGFに反応性を有する本発明のモノクローナル抗体（あるいは抗体フラグメント）を固定化した後、該フィルターあるいはメンブレンに試料を接触させることにより該試料中に含まれるCTGFを分離する方法、及び（２）前述のようなセルロース系担体、アガロース系担体、ポリアクリルアミド系担体、デキストラン系担体、ポリスチレン系担体、ポリビニルアルコール系担体、ポリアミノ酸系担体あるいは多孔性シリカ系担体等のような不溶性担体上に本発明の哺乳動物のCTGFに反応性を有するモノクローナル抗体（あるいは抗体フラグメント）を常法により固定化（物理的吸着、架橋による高分子化、マトリックス中への封印あるいは非共有結合等による固定化）し、該不溶性担体をガラス製、プラスチック製あるいはステンレス製等のカラムに充填し、該カラム（例えば、円柱状カラム）に、試料（例えば、血清若しくは血漿等の体液試料、培養上清あるいは遠心上清等）を通じて溶出させることにより、該試料中に含まれるCTGFを分離あるいは精製する方法である。後者（２）の方法を特にアフィニティーカラムクロマトグラフィーという。

【0094】

該アフィニティーカラムクロマトグラフィーに用いられる前記不溶性担体としては、本発明のモノクローナル抗体（あるいは抗体フラグメント）を固定化でき得るものであればどのような不溶性担体でも使用できるが、例えば、市販品である、ファルマシア(Pharmacia)社製のSephacrose 2B、Sephacrose 4B、Sephacrose 6B、CNBr-activated Sepharose 4B、AH-Sepharose 4B、CH-Sepharose 4B、Activated CH-Sepharose 4B、Epoxy-activated Sepharose 6B、Activated thiol-Sepharose 4B、Sephadex、CM-Sephadex、ECH-Sepharose 4B、EAH-Sepharose 4B、NHS-activated SepharoseあるいはThiopropyl Sepharose 6B等、バイオラッド(Bio-Rad)社製のBio-Gel A、Cellex、Cellex AE、Cellex-CM、Cellex PAB、Bio-Gel P

、Hydrazide Bio-Gel P、Aminoethyl Bio-Gel P、Bio-Gel CM、Affi-Gel 10、Affi-Gel 15、Affi-Prep 10、Affi-Gel Hz、Affi-Prep Hz、Affi-Gel 102、CM Bio-Gel A、Affi-Gel heparin、Affi-Gel 501あるいはAffi-Gel 601等、和光純薬工業社製のクロマゲルA、クロマゲルP、エンザフィックス P-HZ、エンザフィックスP-SHあるいはエンザフィックスP-AB等、セルバ(Serva)社製のAE-Cellulose、CM-CelluloseあるいはPAB Cellulose等を挙げることができる。

【0095】

本発明における「医薬組成物」は、有効成分としての本発明のモノクローナル抗体若しくはその一部、後述の「CTGF阻害剤」、「CTGF産生抑制剤」または「CTGFの刺激の刺激により増殖する能力を有する細胞のCTGFの刺激による増殖を抑制する能力を有する物質」のいずれかと「薬学的に許容され得る担体」とからなる医薬品として有用な組成物である。

ここで「薬学的に許容され得る担体」とは、賦形剤、希釈剤、増量剤、崩壊剤、安定剤、保存剤、緩衝剤、乳化剤、芳香剤、着色剤、甘味剤、粘稠剤、矯味剤、溶解補助剤あるいはその他の添加剤等が挙げられる。

そのような担体の一つ以上を用いることにより、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、注射剤、液剤、カプセル剤、トロー剤、エリキシル剤、懸濁剤、乳剤あるいはシロップ剤等の形態の医薬組成物を調製することができる。

これらの医薬組成物は、経口あるいは非経口的に投与することができる。非経口投与のためのその他の形態としては、一つまたはそれ以上の活性物質を含み、常法により処方される外用液剤、腸溶内投与のための坐剤およびベッサリーなどが含まれる。

【0096】

投与量は、患者の年齢、性別、体重及び症状、治療効果、投与方法、処理時間、あるいは該医薬組成物に含有される活性成分（前記タンパクや抗体など）の種類などにより異なるが、通常成人一人当たり、一回につき10 μ gから1000mg（あるいは10 μ gから500mg）の範囲で投与することができる。しかしながら、投与量は種々の条件により変動するため、上記投与量より少ない量で十分な場合もあり、また上記の範囲を越える投与量が必要な場合もある。

とりわけ注射剤の場合には、例えば生理食塩水あるいは市販の注射用蒸留水等の非毒性の薬学的に許容され得る担体中に $0.1\mu\text{g}$ 抗体/ ml 担体 $\sim 10\text{mg}$ 抗体/ ml 担体の濃度となるように溶解または懸濁することにより製造することができる。

【0097】

このようにして製造された注射剤は、処置を必要とするヒト患者に対し、1回の投与において 1kg 体重あたり、 $1\mu\text{g}\sim 100\text{mg}$ の割合で、好ましくは $50\mu\text{g}\sim 50\text{mg}$ の割合で、1日あたり1回 \sim 数回投与することができる。投与の形態としては、静脈内注射、皮下注射、皮内注射、筋肉内注射あるいは腹腔内注射のような医療上適当な投与形態が例示できる。好ましくは静脈内注射である。

また、注射剤は、場合により、非水性の希釈剤（例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類など）、懸濁剤あるいは乳濁剤として調製することもできる。

そのような注射剤の無菌化は、バクテリア保留フィルターを通す濾過滅菌、殺菌剤の配合または照射により行うことができる。注射剤は、用時調製の形態として製造することができる。即ち、凍結乾燥法などによって無菌の固体組成物とし、使用前に無菌の注射用蒸留水または他の溶媒に溶解して使用することができる。

【0098】

本発明の医薬組成物は、生体の種々の組織に由来するCTGFの刺激により増殖する能力を有する細胞（例えば、種々の繊維芽細胞、種々の血管内皮細胞、種々の細胞など）の増殖を抑制するために有用である。該組織としては、例えば、脳、頸部、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、胃、大腸、小腸、十二指腸、骨髄、子宮、卵巣、精巣、前立腺、皮膚、口腔、舌、及び血管が挙げられる。好ましくは、肺、肝臓、腎臓または皮膚を挙げることができる。

上述したとおり、本発明の医薬組成物は、上記のようなCTGFの刺激により増殖する能力を有する細胞の増殖を抑制することから、本発明の医薬組成物は、また、上記のような種々の組織における該細胞の増殖を伴う種々の疾患の治療または予防のための医薬品として有用である。当該疾患における細胞増殖を伴う組織としては、例えば、脳、頸部、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、胃、大腸、小

腸、十二指腸、骨髓、子宮、卵巣、精巣、前立腺、皮膚、口腔、舌、及び血管が挙げられる。好ましくは、肺、肝臓、腎臓または皮膚を挙げることができる。

【0099】

該疾患としては、例えば、種々組織における繊維症（腎繊維症、肺繊維症、肝臓における繊維症、皮膚における繊維症など）、腎臓疾患（例えば、腎繊維症、腎炎、腎不全など）、肺における疾患（例えば、肺繊維症、肺炎など）、皮膚疾患（例えば、乾癬、強皮症、アトピー、ケロイドなど）、肝臓疾患（例えば、肝臓での繊維症、肝炎、肝硬変など）、関節炎（例えば、慢性関節リウマチ）、種々の癌、あるいは動脈硬化症等の治療または予防への適用が可能である。

好ましくは、腎臓疾患（例えば、腎繊維症、腎炎、腎不全など）、肺における疾患（例えば、肺繊維症、肺炎など）、皮膚疾患（例えば、乾癬、強皮症、アトピー、ケロイドなど）、あるいは肝臓疾患（例えば、肝臓での繊維症、肝炎、肝硬変など）を挙げることができる。

さらに好ましくは、腎臓疾患（例えば、腎繊維症、腎炎、腎不全など）をあげることができる。

【0100】

また、本発明の医薬組成物には、「CTGF阻害剤」、「CTGF産生阻害剤」、あるいは「CTGFの刺激の刺激により増殖する能力を有する細胞のCTGFの刺激による増殖を抑制する能力を有する物質」を含んでなる医薬組成物も包含される。

ここで、該「CTGF阻害剤」、該「CTGF産生阻害剤」あるいは該「物質」とは、CTGFの生物学的機能を抑制または阻害する活性を有する物質または各種細胞からのCTGFの産生を抑制若しくは阻害する活性を有する物質を意味する。例えば下記のいずれかの活性を有する物質を挙げることができる。

(1) ヒト腎臓由来繊維芽細胞（例えば、細胞株293-T（ATCC CRL-1573））とヒトのCTGFとの結合、または該細胞とマウスのCTGFとの結合を抑制若しくは阻害する。

(2) ラット腎臓由来繊維芽細胞株（例えば、細胞株NRK-49F（ATCC CRL-1570））、ヒト骨肉腫由来細胞株MG-63（ATCC CRL-1427）またはヒト肺由来繊維芽細胞株

胞のいずれかとヒトのCTGFとの結合を抑制若しくは阻害する。

(3) ヒトのCTGFまたはマウスのCTGFの刺激によるラット腎臓由来繊維芽細胞株（例えば、細胞株NRK-49F (ATCC CRL-1570)）の細胞増殖を抑制若しくは阻害する。

(4) ヒドロキシプロリンの生成が上昇傾向を示している腎臓における該ヒドロキシプロリンの生成の上昇を抑制若しくは阻害する。

【0101】

上述の「物質」は具体的には、例えば下記のような物質を挙げることができる。

(a) 前述した本発明のモノクローナル抗体（天然由来の抗体若しくは組換え抗体に限らない。）または該抗体の一部。

(b) アンチセンスDNA。

(c) アンチセンスRNA。

(d) 上記(a)乃至(c)以外の低分子化学物質（化学的合成物または天然物）。

【0102】

本発明におけるアンチセンスDNAとは、哺乳動物（好ましくはヒト）のCTGFタンパクをコードするDNAの塩基配列中の部分塩基配列を含むDNA若しくは該DNAの一部が化学修飾されているDNA、または該部分塩基配列に相補的な塩基配列を含むDNA若しくは該DNAの一部が化学修飾されているDNAをあげることができる。

【0103】

ここで、「部分塩基配列」とは、哺乳動物（好ましくはヒト）のCTGFタンパクをコードするDNAの塩基配列中に含まれる任意の部位における任意の数の塩基からなる部分塩基配列を意味する。

該DNAは、該タンパクコードするDNAまたはRNAにハイブリダイズすることにより、該DNAのmRNAへの転写あるいは該mRNAのタンパクへの翻訳を阻害することにより、CTGFタンパクの産生を阻害することができる。

【0104】

該部分塩基配列としては、連続した5乃至100塩基の部分塩基配列が挙げられ、好ましくは、連続した5乃至70塩基の部分塩基配列、さらに好ましくは連続した5乃至50塩基の部分塩基配列、より好ましくは連続した5乃至30塩基の部分塩基配列が挙げられる。

また、このDNAをアンチセンス医薬として用いる場合には、該DNAが患者の体内に投与された場合の血中半減期の増大（安定性）、細胞内膜の透過性の増大、あるいは経口投与の場合の消化器官での分解耐性の増大若しくは吸収の増大などの目的のために、該DNAの塩基配列の一部に化学修飾を施すことが可能である。化学修飾としては、例えば、オリゴヌクレオチドの構造中のリン酸結合、リボース、核酸塩基、糖部位、3' 及び／または5' 末端等の化学修飾が挙げられる。

【0105】

リン酸結合の修飾としては、1以上の該結合を、ホスホジエステル結合（D-オリゴ）、ホスホロチオエート結合、ホスホロジチオエート結合（S-オリゴ）、メチルホスホネート結合（MP-オリゴ）、ホスホロアミデート結合、非リン酸結合及びメチルホスホノチオエート結合のいずれかまたはそれらの組み合わせへの変更を挙げることができる。リボースの修飾としては、2'-フルオロリボースあるいは2'-O-メチルリボースへなどへの変更を挙げることができる。核酸塩基の修飾としては、5-プロピニルウラシルまたは2-アミノアデニンなどへの変更が挙げられる。

【0106】

本発明におけるアンチセンスRNAとは、哺乳動物（好ましくはヒト）のCTGFタンパクをコードするRNAの塩基配列中の部分塩基配列を含むRNA若しくは該RNAの一部が化学修飾されているRNA、または該部分塩基配列に相補的な塩基配列を含むRNA若しくは該RNAの一部が化学修飾されているRNAをあげることができる。

【0107】

ここで、「部分塩基配列」とは、哺乳動物（好ましくはヒト）のCTGFタンパクをコードするRNAの塩基配列中に含まれる任意の部位における任意の数の

塩基からなる部分塩基配列を意味する。

該RNAは、該タンパクコードするDNAまたはRNAにハイブリダイズすることにより、該DNAのmRNAへの転写あるいは該mRNAのタンパクへの翻訳を阻害することにより、CTGFタンパクの産生を阻害することができる。

【0108】

該部分塩基配列としては、連続した5乃至100塩基の部分塩基配列が挙げられ、好ましくは、連続した5乃至70塩基の部分塩基配列、さらに好ましくは連続した5乃至50塩基の部分塩基配列、より好ましくは連続した5乃至30塩基の部分塩基配列が挙げられる。

また、このRNAをアンチセンス医薬として用いる場合には、該RNAが患者の体内に投与された場合の血中半減期の増大（安定性）、細胞内膜の透過性の増大、あるいは経口投与の場合の消化器官での分解耐性の増大若しくは吸収の増大などの目的のために、該RNAの塩基配列の一部に化学修飾を施すことが可能である。化学修飾としては、例えば、オリゴヌクレオチドの構造中のリン酸結合、リボース、核酸塩基、糖部位、3' 及び/または5' 末端等の化学修飾が挙げられる。

【0109】

リン酸結合の修飾としては、1以上の該結合を、ホスホジエステル結合（D-オリゴ）、ホスホロチオエート結合、ホスホロジチオエート結合（S-オリゴ）、メチルホスホネート結合（MP-オリゴ）、ホスホロアミデート結合、非リン酸結合及びメチルホスホノチオエート結合のいずれかまたはそれらの組み合わせへの変更を挙げることができる。リボースの修飾としては、2'-フルオロリボースあるいは2'-O-メチルリボースへなどへの変更を挙げることができる。核酸塩基の修飾としては、5-プロピニルウラシルまたは2-アミノアデニンなどへの変更が挙げられる。

【0110】

また、本発明の医薬組成物の種々疾患症状の治療効果については、常法に従って、既知の疾患モデル動物に投与することにより試験、検討することができる。

例えば、組織繊維症の一つであり、また腎臓疾患の一つでもある腎繊維症の治

療効果の検討の場合には、マウスの一方の尿管を結紮し腎臓の血液等のろ過機能を停止させることにより腎機能不全を惹起させたモデルマウス（UUOモデル、Uni lateral ureteral obstruction）に、本発明の医薬組成物を投与し、該腎機能不全により惹起される腎炎及び腎繊維症の発症の指標であるヒドロキシプロリンの生成の上昇を抑制する程度を測定する方法を用いることができる。該ヒドロキシプロリンの濃度の低減は、該医薬組成物が該腎臓疾患の治療に有効であることを示すものである。

【0111】

腎疾患、例えば、微小糸球体異常（例えば、ネフローゼ型微小変化群（MCNS））、巣状糸球体硬化症（FGS）、膜性糸球体腎炎（膜性腎症、MN）、IgA腎症、メサングウム増殖性腎炎、溶連菌感染後急性糸球体腎炎（APSGN）、半月体形成性（管外性）腎炎、間質性腎炎、あるいは急性腎不全などについては、既報に詳述されるモデル動物を用いることができる（「疾患別モデル動物の作製と新薬開発のための試験・実験法」、p.34-46、1993、技術情報協会（発行））。

皮膚疾患、例えば、創傷、ケロイド、アトピー、皮膚炎、強皮症あるいは乾癬などについては、既報に詳述されるモデル動物を用いることができる（「疾患別モデル動物の作製と新薬開発のための試験・実験法」、p.229-235、1993、技術情報協会（発行））。

【0112】

肝臓疾患、例えば、肝炎（例えば、ウイルス性肝炎（A型、B型、C型、E型など）など）、肝硬変あるいは薬物肝障害などについては、既報に詳述されるモデル動物を用いることができる（「疾患別モデル動物の作製と新薬開発のための試験・実験法」、p.119-129及びp.349-358、1993、技術情報協会（発行））。

例えば、動脈硬化症及び再狭窄への効果の検討の場合には、ラット大動脈にバルーンカテーテルを挿入しPTCAを施し疑似的に作成した再狭窄モデルを使用することができる。

【0113】

例えば、腫瘍の増殖及び転移への効果の確認の場合には、Balb/cマウス等の正常マウス、ヌードマウスもしくはSCIDマウス等のモデルマウス等の市

販のマウスの例えば皮下、尾静脈、脾臓内、腎被膜下、腹腔内あるいは盲腸壁内等に、癌細胞を移植することにより作製した癌転移モデルを用いることができる。

【0114】

本発明の「ラットのCTGF」（具体的には、配列番号2に記載されるアミノ酸配列または該アミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有する）及び「ラットのCTGFをコードするDNA」（具体的には、配列番号1に記載される塩基配列中の塩基番号213乃至1256迄の塩基配列を含むDNA）は、下記のような意味を以て定義されるとともに、下記に述べるような常法に従って製造することができる。

【0115】

なお、「実質的に同一」なる用語は前述のと通りの意味を有する。

本発明の「ラットのCTGF」は、後述するような遺伝子組換え技術のほか、化学的合成法、細胞培養方法等のような当該技術的分野において知られる公知の方法あるいはその修飾方法を適宜用いることにより製造することができる。

本発明の「DNA」は、本発明のラットのCTGFをコードするDNAであって、本発明のラットのCTGFをコードし得るいかなる塩基配列をも包含する。具体的には、配列番号2に記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAが挙げられる。好適な態様としては、配列番号1に記載される塩基配列中の塩基番号213乃至1256迄の塩基配列を含むDNA（例えば、配列番号1に記載の塩基配列を有するDNA）が挙げられる。

【0116】

本発明におけるラットのCTGFをコードするDNAとしては、cDNA及びゲノミックDNAのいずれをも包含する。

本発明においては、同一のアミノ酸をコードするコドンであればどのようなコドンから構成されるDNAを含む。

また、本発明のDNAは、いかなる方法で得られるものであってもよい。例えばmRNAから調製される相補DNA（cDNA）、ゲノムDNAから調製されるDNA、化学合成によって得られるDNA、RNAまたはDNAを鋳型として

PCR法で増幅させて得られるDNAおよびこれらの方法を適当に組み合わせて構築されるDNAをも全て包含するものである。

【0117】

本発明におけるラットのCTGFをコードするDNAは、常法に従って、該ラットのCTGFをコードするmRNAからcDNAをクローン化する方法、ゲノムDNAを単離してスプライシング処理する方法、該cDNA配列若しくはmRNA配列を鋳型としてPCRにより調製する方法、または化学合成する方法等により取得することができる。

本発明のラットのCTGFをコードするDNAは、そのようにして調製した該ラットのCTGFをコードする各々のDNAを適切な制限酵素による切断（消化）し、得られたDNA断片を、必要に応じてリンカーDNAあるいはタグ（Tag）と共に、適切なDNAポリメラーゼ等を用いて連結することにより調製することができる。

【0118】

該ラットのCTGF（以下、目的蛋白という）をコードするcDNAをmRNAからクローン化する方法としては、以下の方法が例示される。

まず、目的蛋白を発現・産生する組織あるいは細胞（例えば、ラット線維芽細胞など）から目的蛋白をコードするmRNAを調製する。mRNAの調製は、例えばグアニジンチオシアネート法（チャーグウィン（Chirgwin）ら、バイオケミストリー（Biochemistry）、第18巻、第5294頁、1979年）、熱フェノール法もしくはAGPC法等の公知の方法を用いて調製した全RNAをオリゴ（dT）セルロースやポリU-セファロース等によるアフィニティークロマトグラフィーにかけることによって行うことができる。

次いで得られたmRNAを鋳型として、例えば逆転写酵素を用いる等の公知の方法、例えばオカヤマらの方法（モレキュラーセルバイオロジー（Mol. Cell. Biol.）、第2巻、第161頁、1982年及び同誌 第3巻、第280頁、1983年）やホフマン（Hoffman）らの方法（ジーン（Gene）、第25巻、第263頁、1983年）等によりcDNA鎖を合成し、cDNAの二本鎖cDNAへの変換を行う。このcDNAをプラスミドベクター、ファージベクターまたはコ

スミドベクターに組み込み、大腸菌を形質転換して、あるいはインビトロパッケージング後、大腸菌に形質移入（トランスフェクト）することによりcDNAライブラリーを作製する。

【0119】

ここで用いられるプラスミドベクターとしては、宿主内で複製保持されるものであれば特に制限されず、また用いられるファージベクターとしても宿主内で増殖できるものであれば良い。常法的に用いられるクローニング用ベクターとしてpUC19、λgt10、λgt11等が例示される。ただし、後述の免疫学的スクリーニングに供する場合は、宿主内で目的蛋白をコードする遺伝子を発現させるプロモーターを有したベクターであることが好ましい。

プラスミドにcDNAを組み込む方法としては、例えばマニアティス (Maniatis) らの方法（モレキュラークローニング、ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, second edition)、コールドスプリングハーバーラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory)、第1.53頁、1989年）に記載の方法などが挙げられる。また、ファージベクターにcDNAを組み込む方法としては、ヒュン (Hyunh) らの方法（DNAクローニング、プラクティカルアプローチ (DNA Cloning, a practical approach)、第1巻、第49頁、1985年）などが挙げられる。簡便には、市販のクローニングキット（例えば、宝酒造社製等）を用いることもできる。このようにして得られる組換えプラスミドやファージベクターは、原核細胞（例えば、E. coli: HB101、DH5α、Y1090、DH10BまたはMC1061/P3等）等の適当な宿主に導入する。

【0120】

プラスミドを宿主に導入する方法としては、（モレキュラークローニング、ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, second edition)、コールドスプリングハーバーラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory)、第1.74頁、1989年）に記載の塩化カルシウム法または塩化カルシウム/塩化ルビジウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられる。また、ファージベクターを宿主に導入する方法としてはファージDNAをインビト

ロパッケージングした後、増殖させた宿主に導入する方法等が例示される。インビトロパッケージングは、市販のインビトロパッケージングキット（例えば、ストラタジーン社製、アマシャム社製等）を用いることによって簡便に行うことができる。

上記の方法によって作製された cDNA ライブラリーから、目的蛋白をコードする cDNA を単離する方法は、一般的な cDNA スクリーニング法を組み合わせることによって行うことができる。

【0121】

例えば、別個に目的蛋白のアミノ酸配列に対応すると考えられるオリゴヌクレオチドを化学合成したのち、これを³²Pでラベルしてプローブとなし、公知のコロニーハイブリダイゼーション法（クランシュタイン（Crunstein）ら、プロシーディングスオブナショナルアカデミーオブサイエンス（Proc. Natl. Acad. Sci. USA）、第72巻、第3961頁、1975年）またはブランクハイブリダイゼーション法（Molecular Cloning, A Laboratory Manual, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory, 第2.108頁、1989年）により、目的の cDNA を含有するクローンをスクリーニングする方法、PCRプライマーを作製し目的蛋白の特定領域をPCR法により増幅し、該領域をコードするDNA断片を有するクローンを選択する方法等が挙げられる。

【0122】

また、cDNAを発現しうるベクター（例えば、λgt11等のファージベクター）を用いて作製した cDNA ライブラリーを用いる場合には、目的蛋白に反応性を有する抗体を用いる抗原抗体反応を利用して、目的のクローンを選択することができる。大量にクローンを処理する場合には、PCR法を利用したスクリーニング法を用いることが好ましい。

この様にして得られたDNAの塩基配列はマキシム・ギルバート法（マキシム（Maxam）ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA.、第74巻、第560頁、1977年）あるいはファージM13を用いたジデオキシヌクレオチド合成鎖停止の方法（サンガー（Sanger）ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA.、第74巻、第5463～5467頁、1977年）によって決定することができる。目的蛋白をコー

ドする遺伝子は、その全部または一部を上記のようにして得られるクローンから制限酵素等により切り出すことにより取得できる。

【0123】

また、前述のような目的蛋白を発現する細胞に由来するゲノムDNAから目的蛋白をコードするDNAを単離することによる調製方法としては、例えば以下の方法が例示される。

該細胞を好ましくはSDSまたはプロテナーゼK等を用いて溶解し、フェノールによる抽出を反復してDNAの脱蛋白質を行う。RNAを好ましくはリボヌクレアーゼにより消化する。得られるDNAを適当な制限酵素により部分消化し、得られるDNA断片を適当なファージまたはコスミドで増幅しライブラリーを作成する。そして目的の配列を有するクローンを、例えば放射性標識されたDNAプローブを用いる方法等により検出し、該クローンから目的蛋白をコードする遺伝子の全部または一部を制限酵素等により切り出し取得する。

【0124】

目的蛋白をコードするDNAのPCRによる調製は、該目的蛋白の既知のmRNAまたはcDNA等を鋳型として常法により調製することができる（「遺伝子増幅PCR法・基礎と新しい展開」、共立出版株式会社発行、1992年など）。

また、化学的合成による目的蛋白をコードするDNAの製造は、目的蛋白の塩基配列をもとにして、常法に従って行うことができる。

【0125】

本発明のラットのCTGFは、上述に例示した方法を用いて調製したラットのCTGFをコードするDNA（cDNAあるいはイントロンを含むゲノミックDNA）を、各々適切な制限酵素で切断することにより、該ラットのCTGFコードするDNA断片を得、それらの断片を、必要に応じてリンカーDNAあるいはタグ（Tag）と共に、適切なDNAポリメラーゼ等を用いて連結させて得たDNAを用いて、慣用される遺伝子組換え技術を用いて、常法により組換え蛋白として調製することができる。

具体的には下記の例示されるとおりである。即ち、上述のようにして調製したDNAを、下記に詳述するようなベクターに挿入して発現ベクターを作成し、該

発現ベクターで後述するような宿主細胞を形質転換して形質転換体を得る。該形質転換体を培養することにより、培養上清中に該目的蛋白を産生させる。培養上清中の該目的蛋白は、カラムクロマトグラフィー等を用いて容易に精製することができる。

【0126】

本発明は、また本発明のラットCTGFをコードするDNAを含有する発現ベクターに関する。本発明の発現ベクターとしては、原核細胞及び／または真核細胞の各種の宿主内で複製保持または自己増殖できるものであれば特に制限されず、プラスミドベクターおよびファージベクターが包含される (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, エルスビュー社、ニューヨーク、1985年)。

当該発現ベクターは、簡便には当業界において入手可能な組換え用ベクター (プラスミドDNAおよびバクテリアファージDNA) に本発明のラットCTGFをコードするDNAを常法により連結することによって調製することができる。用いられる組換え用ベクターとして具体的には、大腸菌由来のプラスミドとして例えばpBR322、pBR325、pUC12、pUC13、pUC19など、酵母由来プラスミドとして例えばpSH19、pSH15など、枯草菌由来プラスミドとして例えばpUB110、pTP5、pC194などが例示される。また、ファージとしては、λファージなどのバクテリオファージが、さらにレトロウイルス、ワクシニヤウイルス、核多角体ウイルスなどの動物や昆虫のウイルス (pVL1393、インビトロゲン社製) が例示される。

【0127】

本発明のラットCTGFをコードするDNAを発現させ該ラットCTGFを生産させる目的においては、プラスミドベクターが有用である。プラスミドベクターとしては、原核細胞および／または真核細胞の各種の宿主細胞中で該ラットCTGFをコードする遺伝子を発現し、これらのポリペプチドを生産する機能を有するものであれば特に制限されない。例えば、pMAL C2、pcDNA3.1(-)、pEF-BOS (ヌクレイックアシッドリサーチ (Nucleic Acid Research)、第18巻、第5322頁、1990年等) あるいはpME18S (実験医学別冊「遺伝子工学ハンドブック」、1992年等) 等を挙げることができる。

【0128】

宿主細胞として細菌、特に大腸菌を用いる場合、一般に発現ベクターは少なくともプロモーター-オペレーター領域、開始コドン、本発明のタンパクをコードするDNA、終止コドン、ターミネーター領域および複製可能単位から構成される。

宿主として酵母、動物細胞または昆虫細胞を用いる場合、発現ベクターは少なくともプロモーター、開始コドン、本発明のラットCTGFをコードするDNA、終止コドンを含んでいることが好ましい。またシグナルペプチドをコードするDNA、エンハンサー配列、本発明のラットCTGFをコードする遺伝子の5'側および3'側の非翻訳領域、スプライシング接合部、ポリアデニレーション部位、選択マーカー領域または複製可能単位などを含んでいてもよい。また、目的に応じて通常用いられる遺伝子増幅遺伝子（マーカー）を含んでいてもよい。

【0129】

細菌中で本発明のラットCTGFを発現させるためのプロモーター-オペレーター領域は、プロモーター、オペレーターおよびShine-Dalgarno(SD)配列（例えば、AAGGなど）を含むものである。例えば宿主がエシェリキア属菌の場合、好適にはTrpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λPLプロモーター、lppプロモーター、tacプロモーターなどを含むものが例示される。

酵母中で本発明のラットCTGFを発現させるためのプロモーターとしては、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターが挙げられ、宿主がバチルス属菌の場合は、SL01プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモーターなどが挙げられる。

また、宿主が哺乳動物細胞等の真核細胞である場合、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、ヒートショックプロモーターなどが挙げられる。好ましくは、SV-40、レトロウイルスである。しかし、特にこれらに限定されるものではない。また、発現にはエンハンサーの利用も効果的な方法である。

【0130】

好適な開始コドンとしては、メチオニンコドン(ATG)が例示される。

終止コドンとしては、常用の終止コドン（例えば、TAG、TAA、TGA）が例示される。

ターミネーター領域としては、通常用いられる天然または合成のターミネーターを用いることができる。

複製可能単位とは、宿主細胞中でその全DNA配列を複製することができる能力をもつDNAを言い、天然のプラスミド、人工的に修飾されたプラスミド（天然のプラスミドから調製されたDNAフラグメント）および合成プラスミド等が含まれる。好適なプラスミドとしては、E.coliではプラスミドpBR322、もしくはその人工的修飾物（pBR322を適当な制限酵素で処理して得られるDNAフラグメント）が、酵母では酵母2 μ プラスミド、もしくは酵母染色体DNAが、また哺乳動物細胞ではプラスミドpRSVneo ATCC 37198、プラスミドpSV2dhfr ATCC 37145、プラスミドpdBPV-MMTneo ATCC 37224、プラスミドpSV2neo ATCC 37149、プラスミドpSV2bsr等があげられる。

エンハンサー配列、ポリアデニレーション部位およびスプライシング接合部位については、例えばそれぞれSV40に由来するもの等、当業者において通常使用されるものを用いることができる。

【0131】

選択マーカーとしては、通常使用されるものを常法により用いることができる。例えばテトラサイクリン、アンピシリン、またはカナマイシン等の抗生物質耐性遺伝子等が例示される。

遺伝子増幅遺伝子としては、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）遺伝子、チミジンキナーゼ遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、グルタミン酸合成酵素遺伝子、アデノシンデアミナーゼ遺伝子、オルニチンデカルボキシラーゼ遺伝子、ヒグロマイシン-B-ホスホトランスフェラーゼ遺伝子、アスパルラートトランスカルバミラーゼ遺伝子等を例示することができる。

【0132】

本発明の発現ベクターは、少なくとも、上述のプロモーター、開始コドン、本発明のタンパクをコードするDNA、終止コドンおよびターミネーター領域を連続的かつ環状に適当な複製可能単位に連結することによって調製することができる。

る。またこの際、所望により制限酵素での消化やT4 DNAリガーゼを用いるライゲーション等の常法により適当なDNAフラグメント（例えば、リンカー、他のリストリクションサイトなど）を用いることができる。

本発明の形質転換細胞は、上述の発現ベクターを宿主細胞に導入することにより調製することができる。

【0133】

本発明で用いられる宿主細胞としては、前記の発現ベクターに適合し、形質転換されうるものであれば特に限定されず、本発明の技術分野において通常使用される天然細胞あるいは人工的に樹立された組換え細胞など種々の細胞（例えば、細菌（エシェリキア属菌、バチルス属菌）、酵母（サッカロマイセス属、ピキア属など）、動物細胞または昆虫細胞など）が例示される。

好ましくは大腸菌あるいは動物細胞であり、具体的には大腸菌（DH5 α 、DH10B、TB1、HB101、XL-2Blue等）、マウス由来細胞（COP、L、C127、Sp2/0、NS-1またはNIH3T3等）、ラット由来細胞、ハムスター由来細胞（BHKおよびCHO等）、サル由来細胞（COS1、COS3、COS7、CV1及びVelo等）およびヒト由来細胞（Hel a、2倍体線維芽細胞に由来する細胞、ミエローマ細胞およびNamalwa等）などが例示される。

発現ベクターの宿主細胞への導入（形質転換（形質移入））は従来公知の方法を用いて行うことができる。

【0134】

例えば、細菌（E.coli、Bacillus subtilis等）の場合は、例えばCohenらの方法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA.、第69巻、第2110頁、1972年）、プロトプラスト法（Mol. Gen. Genet.、第168巻、第111頁、1979年）やコンピテント法（ジャーナルオブモレキュラーバイオロジー（J. Mol. Biol.）、第56巻、第209頁、1971年）によって、Saccharomyces cerevisiaeの場合は、例えばハイネン（Hinnen）らの方法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA.、第75巻、第1927頁、1978年）やりチウム法（J. Bacteriol.、第153巻、第163頁、1983年）によって、動物細胞の場合は、例えばグラハム（Graham）の方法（バイロロジー（Virology）、第52巻、第456頁、19

73年)、昆虫細胞の場合は、例えばサマーズ (Summers) らの方法 (Mol. Cell . Biol., 第3巻、第2156～第2165頁、1983年) によってそれぞれ形質転換することができる。

【0135】

本発明のラットCTGFは、上記の如く調製される発現ベクターを含む形質転換細胞(以下、形質移入体を包含する意味で使用する。)を栄養培地で培養することによって製造することができる。

栄養培地は、宿主細胞(形質転換体)の生育に必要な炭素源、無機窒素源もしくは有機窒素源を含んでいることが好ましい。炭素源としては、例えばグルコース、デキストラン、可溶性デンプン、ショ糖などが、無機窒素源もしくは有機窒素源としては、例えばアンモニウム塩類、硝酸塩類、アミノ酸、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などが例示される。また所望により他の栄養素(例えば、無機塩(例えば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウム)、ビタミン類、抗生物質(例えばテトラサイクリン、ネオマイシン、アンピシリン、カナマイシン等)など)を含んでいてもよい。

培養は当業界において知られている方法により行われる。培養条件、例えば温度、培地のpHおよび培養時間は、本発明のタンパクが大量に生産されるように適宜選択される。

【0136】

なお、下記に宿主細胞に応じて用いられる具体的な培地および培養条件を例示するが、何らこれらに限定されるものではない。

宿主が細菌、放線菌、酵母、糸状菌である場合、例えば上記栄養源を含有する液体培地が適当である。好ましくは、pHが5～8である培地である。

宿主がE.coliの場合、好ましい培地としてLB培地、M9培地(ミラー (Miller) ら、Exp. Mol. Genet, Cold Spring Harbor Laboratory, 第431頁、1972年)、YT培地等が例示される。かかる場合、培養は、必要により通気、攪拌しながら、通常14～43℃、約3～24時間行うことができる。

【0137】

宿主がBacillus属菌の場合、必要により通気、攪拌をしながら、通常30～40℃、約16～96時間行うことができる。

宿主が酵母である場合、培地として、例えばBurkholder最小培（ボスチアン（Bostian）、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第77巻、第4505頁、1980年）が挙げられ、pHは5～8であることが望ましい。培養は通常約20～35℃で約14～144時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。

宿主が動物細胞の場合、培地として例えば約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地（サイエンス（Science）、第122巻、第501頁、1952年）、DMEM培地（バイロロジー（Virology）、第8巻、第396頁、1959年）、RPMI 1640培地（J. Am. Med. Assoc.、第199巻、第519頁、1967年）、199培地（proc. Soc. Exp. Biol. Med.、第73巻、第1頁、1950年）、HamF12培地等を用いることができる。培地のpHは約6～8であるのが好ましく、培養は通常約30～40℃で約15～72時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。

【0138】

宿主が昆虫細胞の場合、例えば胎児牛血清を含むGrace's培地（Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第82巻、第8404頁、1985年）等が挙げられ、そのpHは約5～8であるのが好ましい。培養は通常約20～40℃で15～100時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。

本発明のラットCTGFは、上述のような形質転換細胞（特に動物細胞または大腸菌）を培養することにより、培養上清中に分泌させることにより製造することができる。即ち、得られた培養物を濾過または遠心分離等の方法で培養濾液（上清）を得、該培養濾液から天然または合成蛋白質を精製並びに単離するために一般に用いられる常法に従って該本発明のラットCTGFを精製、単離する。

【0139】

単離、精製方法としては、例えばアフィニティーカラムクロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、塩析、溶媒沈澱法等の溶解度を利用する方法、透析、限外濾過、ゲル濾過、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動など分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーやヒ

ドロキシルアパタイトクロマトグラフィーなどの荷電を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動などの等電点の差を利用する方法などが挙げられる。

【0140】

一方、本発明のラットCTGFが培養された形質転換体のペリプラズムまたは細胞質内に存在する場合は、培養物を濾過または遠心分離などの常法に付して菌体あるいは細胞を集め、適当な緩衝液に懸濁し、例えば超音波やリゾチーム及び凍結融解などの方法で細胞等の細胞壁および／または細胞膜を破壊した後、遠心分離やろ過などの方法で本発明のラットCTGFを含有する膜画分を得る。該膜画分をトライトン-X100等の界面活性剤を用いて可溶化して粗溶液を得る。そして、当該粗溶液を先に例示したような常法を用いることにより、単離、精製することができる。

【0141】

本発明における「トランスジェニックマウス」は、上述のような方法に従って調製できるヒトCTGFをコードするDNA（cDNAまたはゲノミックDNA）がマウスの内在性遺伝子座上にインテグレート（integrate）されているトランスジェニックマウスであり、該トランスジェニックマウスは、体内にヒトCTGFを発現、分泌する。

【0142】

該トランスジェニックマウスは、前述したようなトランスジェニック動物の製造において通常使用されるような常法（例えば、最新動物細胞実験マニュアル、エル・アイ・シー発行、第7章、第361～第408頁、1990年を参照）に従って作製することが可能である。具体的には、例えば、正常マウス胚盤胞（blastocyst）のから取得したES細胞（embryonic stem cell）を、該ヒトCTGFをコードする遺伝子が発現可能なように挿入された発現ベクターで形質転換する。ヒトCTGFをコードする遺伝子が内在性遺伝子座上にインテグレートされたES細胞を常法により選別する。次いで、選別したES細胞を、別の正常マウスから取得した受精卵（胚盤胞）にマイクロインジェクションする（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.77, No.12, pp.7380-7384, 1980；米国特許第4,873,191号公

報)。該胚盤胞を仮親としての別の正常マウスの子宮に移植する。そうして該仮親マウスから、キメラトランスジェニックマウスが生まれる。該キメラトランスジェニックマウスを正常マウスと交配させることによりヘテロトランスジェニックマウスを得る。該ヘテロ (heterogeneous) トランスジェニックマウス同士を交配することにより、メンデルの法則に従って、ホモ (homogeneous) トランスジェニックマウスが得られる。

【0143】

【実施例】

以下、実施例を以て本発明をさらに詳細に説明するが、本発明が該実施例に記載される態様のみに限定されるものではないことは言うまでもない。

【0144】

実施例1 ヒトCTGFに対するポリクローナル抗体の調製

ヒトCTGFの第242乃至第252番目のアミノ酸配列 (Cys-Glu-Ala-Asp-Leu-Glu-Glu-Asn-Ile-Lys) にあたるペプチドを、ペプチドシンセサイザー (Applied Biosystems社製) を用いて常法に従って合成した。免疫感作抗原としては、該ペプチドをフロインド完全アジュバント (Freund's complete adjuvant) とともにエマルジョン化したものを用いた。該ペプチド (0.32mg/kg) を、ニュージーランドホワイトウサギ (NZW, Simunek, Inc.製) の皮下に1日目 (0.8mg)、14日目 (0.8mg)、35日目 (0.8mg) 及び49日目 (0.8mg) という間隔及び量で投与した。該ペプチドを用いて、適宜、血清中の抗体価を測定した。次いで、常法により血清を取得し、該ペプチドをカップリングさせたアガロースを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより該血清から、ヒトCTGFに対するポリクローナル抗体 (IgG) を精製した。ヒトCTGFに対する反応性を、ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) 及びウェスタンブロッティングにより確認した。

【0145】

実施例2 組換えヒトCTGFの調製

<2-1>ヒト腎臓由来線維芽細胞株293での一過性発現

ヒトCTGFをコードするcDNAをPCR法を用いて常法により調製した。

具体的には、ヒト軟骨腫細胞株HCS2/8から調製したcDNAを鋳型とし、ヒトCTGFのcDNA (The Journal of Cell Biology, Vol.114, No.6, p.1287-1294, 1991) を基に設計したプライマーを用いて合成した。得られた翻訳領域を含むヒトCTGFのcDNAをプラスミドp cDNA3.1(-) (Invitrogen社製) に挿入し発現ベクターを作成し、エレクトロポレーションにより、該ベクターでヒト腎臓由来線維芽細胞株293-T (ATCC CRL-1573) を形質転換した。形質転換細胞を、無血清培地ASF104 (味の素社製) 中で3日間培養し、組換えヒトCTGFを一過性に発現させた。ヒトCTGFの発現を、実施例1で調製したポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロッティングにより確認した。

培養上清を回収し、硫酸アンモニウム沈澱法に供した後、ヘパリンカラムクロマトグラフィーに供し、0.3MのNaCl/PBSで洗浄した後、0.5MのNaCl/PBSで溶出し、部分精製ヒトCTGF画分を得た。

【0146】

<2-2>ヒト上皮様細胞株Helaでの安定発現

実施例<2-1>と同様の方法により、ヒトCTGFをコードするcDNAをPCR法を用いて常法により調製した。得られた翻訳領域を含むヒトCTGFのcDNAをプラスミドp cDNA3.1(-) (Invitrogen社製) に挿入し発現ベクターを作成し、エレクトロポレーションにより、該ベクターでヒト上皮様細胞株Hela (ATCC CCL-2) を形質転換した。形質転換細胞を、Geneticin (0.8mg/ml; GIBCO-BRL社製) 及び10%ウシ胎児血清 (fetal calf serum) を含有するRPMI1640培地中で約2週間培養することにより、Geneticin耐性形質転換細胞クローンを選別した。選別された形質転換細胞を、無血清培地ASF104 (味の素社製) 中で培養し、組換えヒトCTGFを発現させた。ヒトCTGFの発現を、実施例1で調製したポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロッティングにより確認した。

培養上清を回収し、硫酸アンモニウム沈澱法に供した後、ヘパリンカラムクロマトグラフィーに供し、0.3MのNaCl/PBSで洗浄した後、0.5MのNaCl/PBSで溶出し、部分精製ヒトCTGF画分を得た。

【0147】

実施例3 組換えマウスCTGFの調製

既報のマウスCTGFをコードするcDNA配列（特開平5-255397号公報、Cell Growth Differ., Vol.2, No.5, p.225-233, 1991; FEBS Letters, Vol.327, No.2, p.125-130, 1993; 及びDNA Cell Biol., Vol.10, No.4, p.293-300, 1991を参照。）に基づき、実施例2と同様にして部分精製組換えマウスCTGFを調製した。

【0148】

実施例4 抗ヒトCTGFモノクローナル抗体並びに抗マウスCTGFモノクローナル抗体の調製

本実施例におけるモノクローナル抗体の作製は、実験医学（別冊）細胞工学ハンドブック（黒木登志夫ら編集、羊土社発行、第66～第74頁、1992年）及び単クローン抗体実験操作入門（安東民衛ら著作、講談社発行、1991年）等に記載されるような一般的方法に従って調製した。

免疫原としてのヒトCTGFは、実施例2で2種類の方法を用いて調製した組換えヒトCTGFのいずれか、またはそれらの混合物を用いた。またマウスCTGFは、実施例3で調製した組換えマウスCTGFを用いた。

被免疫動物としては、①正常マウス（BALB/cマウス、雌、4～5週齢、静岡研究動物センター（製））、②正常ラット（Wistarラット、雌、4～5週齢、静岡研究動物センター（製））、③正常ハムスター（Armenianハムスター、雄、4～5週齢、オリエンタル酵母（製））並びに④前述の方法を用いて製造したヒト抗体産生トランスジェニックマウス（Nature Genetics, Vol.7, p.13-21, 1994; Nature Genetics, Vol.15, p.146-156, 1997; 特表平4-504365号公報; 特表平7-509137号公報; 日経サイエンス、6月号、第40～第50頁、1995年等に記載の方法に従って作製した。）を用いた。

特に断わりのない限り、いずれの動物を用いた場合のモノクローナル抗体の作製も同一の方法を用いた。また、細胞培養操作は、マルチウェルマイクロプレートを用いて行った。

【0149】

<4-1> 抗ヒトCTGFモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの調製

前記の正常マウス及びヒト抗体産生トランスジェニックマウスの各々に、実施

例2で調製した部分精製組換えヒトCTGF ($1\mu\text{g}/\text{匹}$) を、完全フロインドアジュバント (Complete Freund's Adjuvant) とともにフッドパッド内注射することにより初回 (0日) 免疫した。初回免疫から1週間毎に同組換えヒトCTGF をフッドパッド内注射により4回以上追加免疫し、さらに以下に述べるリンパ節細胞の取得の前々日にも同様にして最終免疫した。

各々の動物から採取したリンパ節細胞とマウスミエローマ細胞とを5:1で混合し、融合剤としてポリエチレングリコール4000またはポリエチレングリコール1500 (GIBCO社製) を用いて細胞融合させることによりハイブリドーマを作製した。なお、正常マウスのリンパ節細胞の細胞融合は、マウスミエローマPAI (JCR No.B0113; Res. Disclosure Vol. 217, p.155, 1982) を用い、ヒト抗体産生トランスジェニックマウスのリンパ節細胞の細胞融合は、マウスミエローマP3/X63-AG8.653 (ATCC No.: CRL-1580) を用いた。

ハイブリドーマの選択は、10%のウシ胎児血清 (Fetal Calf Serum, FCS) とアミノプテリンを含有するHAT含有ASF104培地 (味の素(製)) 中で培養することにより行った。

各々のハイブリドーマクロンの培養上清の、免疫原として用いた組換えヒトCTGFに対する反応性を、後述するELISAにより測定することにより各々の動物種について多数の抗体産生ハイブリドーマを得た。

【0150】

正常マウス (マウス抗ヒトCTGFモノクローナル抗体) については、8-64-6、8-86-2、8-97-3、8-149-3及び15-38-1と命名したクロンを得た (図1)。

ハイブリドーマクロン8-86-2及び8-64-6は共に、平成9年12月18日付で通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号) に国際寄託した (クロン8-86-2: 国際寄託番号FERM BP-6208; クロン8-64-6: 国際寄託番号FERM BP-6209)。

ヒト抗体産生トランスジェニックマウス (ヒト抗ヒトCTGFモノクローナル抗体) については、A4.3、A11.1、A15.1、A29.6、B13.7、B22.2、B29.6、B35.1、C2.1、C26.11、C59.1、C114.4、M32.2、M33.3、M84.4、M107.2、M122、M124.6、M194.2、M244、M255、M268.1、M288.5、M291.2、M295.2、M315、M320.2、N45。

2、N50.1及びN60.1と命名したクローンを得た（図1及び図2）。

【0151】

ハイブリドーマクローンA11.1は、平成10年9月25日付で通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号）に国際寄託した（国際寄託番号FERM BP-6535）。

また、ハイブリドーマクローンB22.2、M84.4及びM320.2は共に、平成10年12月15日付で通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号）に国際寄託した（クローンB22.2：国際寄託番号FERM BP-6598； クローンM84.4：国際寄託番号FERM BP-6599； クローンM320.2：国際寄託番号FERM BP-6600）。

なお、上記に示したとおり、本実施例を含め以下のいずれの実施例中、並びに当該実施例における試験結果として示した図面または表中においては、本発明のヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンを、記号を用いて命名した。

当該記号中のピリオド記号より前に記載したアルファベットと数字は合わせて親クローンの名前を表す。また、上記各々の親クローンからサブクロニングされたハイブリドーマクローンは、その親クローン名の直後のピリオド記号の次にさらなる番号を付加することによって命名した。

なお、本実施例を含め以下のいずれの実施例中、並びに当該実施例における試験結果として示した図面または表中においては、当該サブクロニングによる番号を省略して記載する場合があるが、それらのいずれも図1または図2に記載したクローンと同一の細胞である。

【0152】

<4-2> 抗マウスCTGFモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの調製

前記の正常ラット及び正常ハムスターに、実施例3で調製した部分精製組換えマウスCTGF（2 μ g/匹）を、完全フロインドアジュバント（Complete Freund's Adjuvant）とともにフッドパッド内注射することにより初回（0日）免疫した。初回免疫から一週間毎に4回以上同組換えマウスCTGFをフッドパッド内注射により追加免疫し、さらに以下に述べるリンパ節細胞の取得の前々日にも同

様にして最終免疫した。

各々の免疫感作動物の膝窩リンパ節細胞を常法に従って外科手術により採取した。

各々の動物から採取したリンパ節細胞とマウスミエローマ細胞 P A I (JCR No. B0113; Res. Disclosure Vol. 217, p.155, 1982) とを 5 : 1 で混合し、融合剤としてポリエチレングリコール4000またはポリエチレングリコール1500 (GIBC 0社製) を用いて細胞融合させることによりハイブリドーマを作製した。

ハイブリドーマの選択は、10%のウシ胎児血清 (Fetal Calf Serum, FCS) とアミノプテリンを含有するHAT含有ASF104培地 (味の素 (製)) 中で培養することにより行った。

【0153】

各々のハイブリドーマクローンの培養上清の、免疫原として用いた組換えマウスCTGFに対する反応性を、後述するELISAにより測定することにより各々の動物種について多数の抗体産生ハイブリドーマを得た。

正常ラット (ラット抗マウスCTGFモノクローナル抗体) については、13-51-2、17-132、23-96、24-53、24-67、25-91、25-101、25-256、25-338、25-410及び25-463と命名したクローンを得た (図1)。

正常ハムスター (ハムスター抗マウスCTGFモノクローナル抗体) については、2-228-1と命名したクローンを得た (図1)。

【0154】

<4-3> モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのELISAによるスクリーニング

実施例<4-1>及び<4-2>で行ったELISAは、下記のとおりである。

実施例2で調製した組換えヒトCTGF (0.2 μ g/ウェル) または実施例3で調製した組換えマウスCTGF (0.2 μ g/ウェル) を、ELISA用96穴マイクロプレート (コーニング (Corning) 社製) の各ウェルに加え、室温で2時間インキュベートし、組換えヒトCTGFまたは組換えマウスCTGFをマイクロプレートに吸着させた。次いで、上清を捨て、各ウェルに、ブロッキング試薬 (200 μ l、3%BSA含有リン酸緩衝液) を加え室温で2時間インキュベートし

、CTGFが結合していない部位をブロックした。各ウェルを、0.1%のTween20を含有するリン酸緩衝液200 μ lで3回洗浄した。このようにして、各ウェルを組換えヒトCTGFまたは組換えマウスCTGFでコーティングしたマイクロプレートを作製した。

各ウェルに、各々のハイブリドーマの培養上清（100 μ l）を加え、40分間反応させた後、各ウェルを、0.1%のTween20を含有するリン酸緩衝液200 μ lで3回洗浄した。

【0155】

次いで、正常マウス由来のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの培養上清を加えたウェルにはビオチンで標識したヒツジ抗マウスイムノグロブリン抗体（50 μ l、アマシャム社製）を、正常ラット由来のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの培養上清を加えたウェルにはビオチンで標識したヒツジ抗ラットイムノグロブリン抗体（50 μ l、アマシャム社製）を、正常ハムスター由来のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの培養上清を加えたウェルにはビオチンで標識したヤギ抗ハムスターイムノグロブリン抗体（50 μ l、Cedarlane社製）を、またヒト抗体産生トランスジェニックマウス由来のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの培養上清を加えたウェルにはビオチンで標識したヤギ抗ヒトイムノグロブリン抗体（50 μ l、アメリカンコーレックス社製）を加え、室温下で1時間インキュベートした。

【0156】

マイクロプレートを、0.1%Tween20を含有するリン酸緩衝液で洗浄後、ウシ血清アルブミン（BSA、1mg/ml）を含有する0.5MのNaClと20mMのHEPESからなる溶液（pH7.0）で1000倍に希釈したストレプトアビジン- β -ガラクトシダーゼ（Streptoavidin- β -galactosidase、50 μ l、Gibco BRL社製）を各ウェルに加え、室温下で30分間インキュベートした。

次いで、マイクロプレートを、0.1%Tween20を含有するリン酸緩衝液で洗浄後、1mg/mlのBSAを含有する100mMのNaCl、1mMのMgCl₂及び10mMのリン酸緩衝液からなる溶液（pH7.0）で希釈した1%の4-メチルーウンベリフェリル- β -D-ガラクトシド（4-Methyl-umbelliferyl- β -D-galactoside、50 μ l、シグマ（Sig

ma) 社製) を各ウェルに加え、室温下で10分間インキュベートした。各ウェルに、1Mの Na_2CO_3 (100 μl) を加え、反応を止めた。波長460nm (励起: 355nm) で蛍光強度をフルオロスキャンIIマイクロプレートフルオロメーター (Fluorosc an II microplate fluorometer、フロー研究所 (Flow Laboratories Inc.) (製)) で測定した。

【0157】

<4-4> モノクローナル抗体の大量調製

ICRヌードマウス (雌、7~8週齢、チャールズリバー社製) に、前記の各々のハイブリドーマクローン (各々 $10^6 \sim 10^7$ 個/0.5ml/マウス) を、腹腔内注射した。10~20日後、マウスを麻酔下で開腹し、常法により採取した腹水から各々のモノクローナル抗体を大量に調製した。

【0158】

<4-5> モノクローナル抗体の精製

前記<4-4>で取得した各々のモノクローナル抗体腹水を遠心して得た遠心上清を、0.06Mの酢酸緩衝液 (pH4.0) で3倍に希釈し、1Nの塩酸を加えpHを4.8に調整した。次いで、カプリル酸 (Caprylic acid、和光純薬工業製) を、腹水1mlに対して0.033mlになるように室温下で攪拌しながら少しずつ加え、攪拌しながら30分間反応させた。次いで、遠心分離 (10,000rpm、20分間) し、抗体以外の蛋白を沈殿させた。遠心上清を回収し、フィルター (ミリポア社製) で濾過し、白沈を除いた。得られた濾液を、リン酸緩衝液で透析 (2時間) した。

透析後、硫酸アンモニウム (26.2g/100ml) を攪拌しながら少しずつ加え、攪拌しながら4℃で120分間反応させた。次いで、遠心分離 (10,000rpm、20分間) して、沈殿物を回収した。回収した沈殿物に、リン酸緩衝液を加え、リン酸緩衝液で透析 (4℃、24時間) し、各々の精製モノクローナル抗体を得た。

【0159】

<4-6> アイソタイプの決定

マウスモノクローナル抗体アイソタイプ決定用キット (アマシャム社製) を用い、該キットに添付の実験操作プロトコールに従って操作を行い、前述の正常マ

ウス由来の抗ヒトCTGFモノクローナル抗体(8-64-6、8-86-2、8-97-3、8-149-3及び15-38-1)の各々のアイソタイプを決定した。いずれもIgG1/κであることが確認された(図1)。

ヒトモノクローナル抗体アイソタイプ決定用キット(アメリカン・コーレックス社製)を用い、該キットに添付の実験操作プロトコールに従って操作を行い、前述のヒト抗体産生トランスジェニックマウス由来のヒト抗ヒトCTGFモノクローナル抗体(A4.3、A11.1、A15.1、A29.6、B13.7、B22.2、B29.6、B35.1、C2.1、C26.11、C59.1、C114.4、M32.2、M33.3、M84.4、M107.2、M122、M124.6、M194.2、M244、M255、M268.1、M288.5、M291.2、M295.2、M315、M320.2、N45.2、N50.1及びN60.1)の各々のアイソタイプを決定した。いずれもIgG2/κであることが確認された(図1及び図2)。

【0160】

<4-7> アフィニティーカラムの作製

NHS活性化ハイトラップカラム(HiTrap-NHS-activated Sepharose HP、5ml、ファルマシアバイオテク社製)を用い、添付のプロトコールに従ってアフィニティーカラムを作製した。具体的には、下記のとおりである。

0.5MのNaClを含有する0.2Mの炭酸水素ナトリウム溶液(pH8.3)中に溶解した実施例<4-5>で調製したモノクローナル抗体8-86-2(10mg/mlセファローズ)を、NHS活性化ハイトラップカラムに注入した。20℃で45分間反応させ、モノクローナル抗体8-86-2をNHS活性化セファローズに固定化した。

モノクローナル抗体8-86-2は、ヒトCTGF、マウスCTGF及びラットCTGFのいずれにも高い反応性を有するため、この抗体を用いたアフィニティーカラムを作製することにより、ヒトCTGF、マウスCTGF及びラットCTGFのいずれも精製することが可能である。

【0161】

<4-8> アフィニティークロマトグラフィーによる哺乳動物CTGFの精製

ヒトCTGFを発現する形質転換Hela細胞(実施例<2-2>)、マウスCTGFを発現する形質転換Hela細胞(実施例3)及びラットCTGFを発現する形質転換Hela細胞(実施例<11-2>)の各々の培養上清を回収し、ヘパリンカ

ラムクロマトグラフィーに供し、0.3MのNaCl/PBSで洗浄した後、0.7MのNaCl/PBSで溶出し、ヒト、マウス及びラットのCTGF各々の粗精製画分を得た。

各々の粗精製物を、実施例<4-7>で作製した抗CTGF抗体8-86-2を固定化したアフィニティーカラムに加え、リン酸緩衝液で洗浄した後、0.1Mのグリシン緩衝液 (pH2.5) で溶出し、0.75MのTris緩衝液 (pH9.0) で中和した。集めた溶出物をリン酸緩衝液で透析し、高純度精製された組換えヒトCTGF、マウスCTGF及びラットCTGFを得た。

各々の精製組換えCTGFを、10乃至20%の濃度勾配のドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動した。分離したバンドを銀染色した結果、ヒト、マウス及びラットのCTGFのいずれについても約38kDa付近にバンドが検出された (図3)。

【0162】

<4-9> 精製CTGFの細胞増殖促進活性の試験

実施例<4-8>で精製した各種組換えCTGFが生物活性を保持しているか否かを確認するため、各々の精製CTGFの細胞増殖促進活性を調べた。

96マイクロプレートを用いて、ラット腎臓線維芽細胞NRK-49F (ATCC CRL-1570; 2×10^3 /ウェル) を、10%ウシ胎児血清 (FCS) 含有DMEM培地中で3日間培養した。培養上清を取り除き、DMEM培地で1回洗浄後、DMEM培地中で1日培養した。次いで、各々の培養系に各種濃度 (100、50、25、12.5、6.3及び3.1ng/ml) の精製組換えCTGFを添加して2日間培養した後、 $[^3\text{H}]$ -Thymidine (3.7kBq/ウェル) を添加してさらに6時間培養した。細胞を回収 (ハーベスト) して、細胞内に取り込まれた $[^3\text{H}]$ -Thymidineの量を液体シンチレーションカウンター (ベックマン社製) にて測定した。なお、対照として、CTGFを添加せず同様にして培養した場合の $[^3\text{H}]$ -Thymidineの取込みを測定した。

結果を図4に示す。ヒト、マウス及びラットのいずれの精製組換えCTGFも、濃度依存的な細胞増殖促進活性を示し、いずれの組換えCTGFも生物学的機能を保持していることが示された。

【0163】

<4-10> 交叉反応性

前述のようにして調製した種々の抗ヒトCTGFモノクローナル抗体 (10 μ g/ml) 及び抗マウスCTGFモノクローナル抗体 (10 μ g/ml) のヒトCTGF、マウスCTGF及びラットCTGFの各々に対する反応性を、実施例<4-3>に述べたELISAと同様にして調べた。

なお、本試験では、実施例<4-7>で作製したアフィニティーカラムを用いて精製したヒト、マウス及びラットの精製組換えCTGFの各々を、(A) 100、30及び10ng/well、または(B) 100、10及び1ng/wellの濃度でコーティングしたマクロプレートを用いた。

なお、(B) の試験においては、陰性対照試験として、前述したヒト抗体産生トランスジェニックマウスに、KLH(keyhole limpet hemocyanin、ピアース(PIERCE)社製) を免疫して調製した抗KLHヒトモノクローナル抗体を用いて、前記と同様にして試験を行った。

濃度(A)での試験結果を図5乃至図7に、また濃度(B)での試験結果を図8乃至図10に示す。

また、図5乃至図10に示した結果を、図1及び図2の「交叉反応性」の欄に簡略化して示した。

図1の「交叉反応性」の欄においては、左から順に、コーティング濃度が、100、30及び10ng/wellでの結果を示す。各濃度における反応性は、蛍光強度が1000以上の場合は「○」を、500以上1000未満の場合は「△」を、また500未満の場合は「×」を付した。

図2の「交叉反応性」の欄においては、左から順に、コーティング濃度が、100、10及び1ng/wellでの結果を示す。各濃度における反応性は、蛍光強度が1000以上の場合は「○」を、500以上1000未満の場合は「△」を、また500未満の場合は「×」を付した。

本発明のモノクローナル抗体は、様々な交叉反応性の特徴を有することが示された。

【0164】

<4-11> CTGFと種々細胞との結合の阻害活性

最近の研究によりCTGFが細胞接着に関与することが明らかになっている (Exp. Cell. Res., Vol.233, p.63-77, 1997)。そこで、前記のようにして調製した種々のモノクローナル抗体がCTGFの機能を阻害する活性(中和活性)を有するか否かを、CTGFが媒介する細胞接着作用に対する阻害効果を指標に調べた。試験は下記<4-11-1>乃至<4-11-3>に記載する3種類の方法を用いた。

【0165】

<4-11-1> ヒト腎臓由来線維芽細胞株293-Tとの結合の阻害

実施例<4-3>と同様にして作製した組換えヒトCTGF固定化マイクロプレート(コーティング濃度: $0.5 \mu\text{g}/\text{well}$)の各ウェルに、前記のようにして調製したヒトCTGFに反応性を有する各種のモノクローナル抗体($0.5 \mu\text{g}/\text{well}$)を加えた。また、実施例<4-3>と同様にして作製した組換えマウスCTGF固定化マイクロプレート(コーティング濃度: $0.5 \mu\text{g}/\text{well}$)の各ウェルに、前記のようにして調製したマウスCTGFに反応性を有する各種のモノクローナル抗体($0.5 \mu\text{g}/\text{well}$)を加えた。

【0166】

各プレートの上清を除いた後、各ウェルにBCECF (2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein tetraacetoxymethyl ester、モレキュラープローブ社)で標識したヒト腎臓由来線維芽細胞株293-T (ATCC CRL-1573) (5×10^4 /ウェル)を加え、4℃で1時間静置した。

浮遊細胞を除去し、1%NP-40含有リン酸緩衝液($100 \mu\text{l}$)を加えて、プレートに接着している細胞を可溶化した。細胞溶解により培養上清中に放出されるBCECFの蛍光強度をフルオロスキャンIIマイクロプレートフルオロメーター (Fluoroscan II microplate fluorometer、フロー研究所 (Flow Laboratories Inc.) (製))を用いて測定した。

なお、対照試験として、いずれの抗体も加えないで上記と同様にして試験を行った。

結果を図11に示す。また、図11の結果を図1の「293細胞の結合阻害活性」の欄に簡略化して示した。図1の当該欄においては、「○」は有意差をもって細胞の接着を阻害する活性を示したこと示し、また「×」印は、該活性を示さな

かったことを示す。

【0167】

<4-11-2> ラット腎臓由来線維芽細胞株NRK-49Fとの結合の阻害

実施例<4-3>と同様にして作製した組換えヒトCTGF固定化マイクロプレート（コーティング濃度：1 $\mu\text{g}/\text{well}$ ）の各ウェルに、前記のようにして調製したヒトCTGFに反応性を有する各種のヒトモノクローナル抗体（最終濃度：20、6または2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を加えた。

次いで、各ウェルにBCECF（2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein tetraacetoxymethyl ester、モレキュラープロブ社）で標識したラット腎臓由来線維芽細胞株NRK-49F（ATCC CRL-1570）（ 1×10^4 /ウェル）を加え、4℃で1時間静置した。

浮遊細胞を除去し、1%NP-40含有リン酸緩衝液（100 μl ）を加えて、プレートに接着している細胞を可溶化した。細胞溶解により培養上清中に放出されるBCECFの蛍光強度をフルオロスキャンIIマイクロプレートフルオロメーター（Fluoroscanner II microplate fluorometer、フロー研究所（Flow Laboratories Inc.）（製））を用いて測定した。

なお、対照試験として、いずれの抗体も加えないで上記と同様にして試験を行った。陰性対照試験として、前述したヒト抗体産生トランスジェニックマウスに、KLH（keyhole limpet hemocyanin、ピアース（PIERCE）社製）を免疫して調製した抗KLHヒトモノクローナル抗体を用いて、前記と同様にして試験を行った。

また、別の対照試験として、CTGFをコーティングしないマイクロプレートウェルを用いて、且ついずれの抗体も加えないで前記と同様にして試験を行った。

結果を図12に示す。なお、結果は、求められた蛍光強度の値を基に、細胞の結合率（%）に換算して示した。

また、図12の結果を図2の「NRK-49F細胞の結合阻害活性」の欄に簡略化して示した。図2の当該欄における「○」印は、有意差をもって細胞の接着を阻害したことを示し、「×」印は、当該阻害活性が弱いまたは阻害活性を示さなかったことを示す。

【0168】

<4-11-3> 種々細胞との結合の阻害

実施例<4-3>と同様にして作製した組換えヒトCTGF固定化マイクロプレート（コーティング濃度： $1\mu\text{g}/\text{well}$ ）の各ウェルに、前記のようにして調製したヒトCTGFに反応性を有する各種のヒトモノクローナル抗体（最終濃度： $20\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を加えた。

60分静置後、各プレートの上清を除いた後、各ウェルにBCECF（2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein tetraacetoxymethyl ester、モレキュラープローブ社）で標識した下記細胞（各々 1×10^4 /ウェル）を加え、4℃で1時間静置した。細胞は下記を用いた。

- (1) ヒト肺由来繊維芽細胞（NHLF2837；Clonetics製）。
- (2) ヒト骨肉腫由来細胞株MG-63（ATCC CRL-1427）。
- (3) ラット腎臓由来線維芽細胞株NRK-49F（ATCC CRL-1570）。

浮遊細胞を除去し、1%NP-40含有リン酸緩衝液（ $100\mu\text{l}$ ）を加えて、プレートに接着している細胞を可溶化した。細胞溶解により培養上清中に放出されるBCECFの蛍光強度をフルオロスキャンIIマイクロプレートフルオロメーター（Fluoroscan II microplate fluorometer、フロー研究所（Flow Laboratories Inc.）（製））を用いて測定した。

なお、対照試験として、いずれの抗体も加えないで上記と同様にして試験を行った。陰性対照試験として、前述したヒト抗体産生トランスジェニックマウスに、KLH(keyhole limpet hemocyanin、ピアース(PIERCE)社製)を免疫して調製した抗KLHヒトモノクローナル抗体を用いて、前記と同様にして試験を行った。

また、別の対照試験として、CTGFをコーティングしないマイクロプレートウェルを用いて、且ついずれの抗体も加えないで前記と同様にして試験を行った。

結果を図13に示す。なお、結果は、求められた蛍光強度の値を基に、細胞の結合率(%)に換算して示した。

【0169】

<4-12> ウサギ組織への交叉反応性

高脂血症モデルウサギWHHL（オリエンタル酵母社製）の動脈硬化巣を外科的手術により採取し、常法により動脈硬化症部位の動脈の凍結切片を調製した。

各切片を、下記に述べるようにベクタステインエリート (Vectastain Elite) ABCキット (フナコシ株式会社製) を用いて染色した。

該切片をアセトンで1～2分間固定し、乾燥後、希釈血清（PBS（10ml）／血清（150 μ l））で30分間湿潤させた。各切片をPBSで洗浄後、1次抗体として前述のようにして調製した正常マウス由来の抗ヒトCTGFモノクローナル抗体（クローン：8-86-2及び8-149-3）、正常ラット由来の抗マウスCTGFモノクローナル抗体（クローン：13-51-2）またはヒト抗体産生トランスジェニックマウス由来の抗ヒトCTGFモノクローナル抗体（クローン：A4.3、A11.1、A29.6、B29.6、B35.1、C26.11及びC114.4）（各々10 μ g/mlあるいはハイブリドーマ培養上清）を加え、40分間静置した。

【0170】

次いで、PBSで洗浄し、ビオチン化二次抗体溶液（100 μ l）を加え、30分間静置した。なお、一次抗体として正常マウス由来の抗ヒトCTGFモノクローナル抗体を用いた場合は、ビオチン標識ウマ抗マウスイムノグロブリン抗体を、一次抗体として正常ラット由来の抗マウスCTGFモノクローナル抗体を用いた場合は、ビオチン標識ウサギ抗ラットイムノグロブリン抗体を、また一次抗体としてヒト抗体産生トランスジェニックマウス由来の抗ヒトCTGFモノクローナル抗体を用いた場合にはビオチン標識ヤギ抗ヒトイムノグロブリン抗体を用いた。

各切片を、メタノール中に溶解した3%過酸化水素溶液中で10分間静置し、PBSで洗浄した後、100 μ lのアビジン-ペルオキシダーゼ溶液 (PBS (5ml) / ペルオキシダーゼ標識アビジンDH (100 μ l) / ビオチン化過酸化水素H (100 μ l)) を加え30分間静置した。

【0 1 7 1】

PBSで洗浄後、DAB溶液（水（5ml）／緩衝溶液（100 μ l）／DAB（ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド）溶液（200 μ l）／過酸化水素溶液（100 μ l））を加え、2～10分間静置した。

冷水で5分間洗浄した後、ギムザ (Giemsa) 染色法に供し封入処理を行った。

なお、1次抗体として、CTGFに対する反応性を有さず、且つアイソタイプの一致したモノクローナル抗体を用いて前記と同様に染色したものを対照とした。染色、封入された各組織切片を100及び200倍の倍率にて顕鏡し、結果を図14に示した。また、図14の結果を図1の「WHHLウサギの動脈硬化巣組織への反応性」の欄に簡略化して示した。図1の当該欄においては、組織切片が染色された場合は「○」を、組織切片の染色が弱いまたは染色されなかった場合は「×」を付した。

ヒト抗体産生トランスジェニックマウス由来の抗ヒトCTGFヒトモノクローナル抗体であるクローンA4.3、A11.1、A29.6、C26.11及びC114.4、並びに正常ラット由来の抗マウスCTGFモノクローナル抗体であるクローン13-51-2は、ウサギの動脈硬化巣組織に反応性を示した。

【0172】

<4-13> CTGF刺激による細胞増殖の阻害活性

前記実施例<4-9>の試験で示されたように、CTGFは、各種細胞（例えば、腎臓や肺等の種々組織に由来する繊維芽細胞、各種腫瘍細胞、及び血管内皮細胞など）の細胞増殖を誘導する。

本試験では、本発明のモノクローナル抗体の、そのようなCTGFの刺激による細胞増殖に対する阻害効果を下記のようにして調べた。

【0173】

<4-13-1> CTGFを含む細胞培養液の調製

ヒト胎児皮膚由来繊維芽細胞 (Neonatal human dermal fibroblast, NHDF; Becton Dickinson製) をシャーレで培養し、ウシ胎児血清 (FCS) を含まないDMEM培養液で2回洗浄後、ヒトTGF- β (Transforming growth factor; 1 ng/ml, R&D Systems製) を含有するDMEM培地を加えさらに1日培養した。

培養上清を回収し、ヘパリンカラム (HiTrap, Pharmacia Biotech製) に添加した。カラムを0.2MのNaCl/PBSで洗浄後、0.6MのNaCl/PBSでカラムにトラップされた因子を溶出させた。溶出液をPBSで透析し、以下の細胞増殖アッセイに用いた。

CTGFはヘパリン結合性であることから、ヘパリンカラムを用いることによ

りCTGFを部分精製することができる。前記で調製したヒトCTGFに対するモノクローナル抗体を用いて、常法に従ってウェスタンブロッティングを行い、上記で得たサンプル中にCTGFが含まれていることを確認した。

【0174】

<4-13-2> 細胞増殖の阻害活性

96穴マイクロタートプレートにラット腎臓由来繊維芽細胞株NRK-49F (ATCC CRL-1570、 1×10^4 個/well)を加え、1日培養した。次いで、プレートをFCSを含まないDMEM培地で2回洗浄した後、さらに1日培養した。次いで、前記<4-13-1>で調製したCTGFサンプル(DMEM培地による20倍希釈物)及び前記で調製した本発明の抗ヒトCTGFヒトモノクローナル抗体(最終濃度:20、2または $0.2 \mu\text{g/ml}$)とを30分間反応させた混合物を各ウェルに加え18時間培養した。次いで、各ウェルに、 $[^3\text{H}]$ -Thymidine (3.7kBq/ウェル)を添加してさらに6時間培養した。細胞を回収(ハーベスト)して、細胞内に取り込まれた $[^3\text{H}]$ -Thymidineの量を液体シンチレーションカウンター(バックマン社製)にて測定した。

なお、陽性対照試験として、いずれの抗体も加えないで上記と同様にして試験を行った。また、陰性対照試験として、CTGFサンプル及びいずれの抗体をも添加せず上記と同様にして試験を行った。

結果を図15及び図16に示す。

また、前記と同様の複数回の試験を行った結果(図15及び図16に示した本試験の結果を含む)を、図2の「NRK-49F細胞の増殖阻害活性」の欄に簡略化して示した。図2の当該欄における「○」は、有意差をもって細胞の増殖を阻害する活性を示したことを意味する。

本発明の抗ヒトCTGFヒトモノクローナル抗体は、ヒト繊維芽細胞の増殖を有意に抑制または阻害することが示された。

【0175】

<4-14> エピトープマッピング

本発明の抗ヒトCTGFヒトモノクローナル抗体が特異的に結合するヒトCTGFの構造中の部位(エピトープ)を解析する目的で下記の試験を行った。

本試験は、後述の実施例 5 に詳述する 2 種類のモノクローナル抗体を用いた本発明のサンドイッチ ELISA を用いて行った。具体的には下記の工程に従った。

(工程 1)

後述の実施例<5-1>と同様にして図 2 に記載される各々の抗ヒト CTGF ヒトモノクローナル抗体 ($0.3 \mu\text{g}/50 \mu\text{l}/\text{well}$) が固定化された抗体固定化マイクロプレートを作製した。

【0176】

(工程 2)

後述の実施例<5-2>と同様にして下記 A 乃至 D の各々の本発明のモノクローナル抗体を標識し、標識モノクローナル抗体を作製した。

[抗体 A]

ヒト CTGF に反応性を有するマウスモノクローナル抗体 8-64-6 (国際寄託番号 FERM BP-6209 で識別されるハイブリドーマに由来する。)

[抗体 B]

抗ヒト CTGF ヒトモノクローナル抗体 A11.1 (国際寄託番号 FERM BP-6535 で識別されるハイブリドーマに由来する。)

[抗体 C]

抗ヒト CTGF ヒトモノクローナル抗体 C26.11 (配列番号 8 に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列を有する重鎖、並びに配列番号 18 に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列を有する軽鎖とからなる。)

[抗体 D]

抗ヒト CTGF ヒトモノクローナル抗体 C59.1 (配列番号 10 に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列を有する重鎖、並びに配列番号 20 に記載されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列を有する軽鎖とからなる。)

(工程 3)

後述の実施例<5-3>と同様にして ELISA を行った。即ち、工程 1 で作製した抗体固定化マイクロプレートの各々に、前記実施例で調製した精製組換えヒト CTGF ($15\text{ng}/\text{well}$) を加えて抗原抗体反応を進めた後、工程 2 で調製した各々の標識モノクローナル抗体 ($0.1 \mu\text{l}/50 \mu\text{l}/\text{well}$) を加えて反応させた。後述の実施例<5-

[illegible]

【0 1 7 8】

本試験の結果は、上記の推定に合致するものであった。結果を図2の「エピソードマッピング」の欄に示した。

なお、以下に図 2 における当該欄に示した各々のアルファベットの意味を例示

的に示す。

「(A)」：前記で標識抗体として用いた「抗体A」であることを意味する。

「(B)」：前記で標識抗体として用いた「抗体B」であることを意味する。

「(C)」：前記で標識抗体として用いた「抗体C」であることを意味する。

「(D)」：前記で標識抗体として用いた「抗体D」であることを意味する。

「A」：「抗体A」のエピトープと同一またはほぼ同一のエピトープであることを意味する。

「B」：「抗体B」のエピトープと同一またはほぼ同一のエピトープであることを意味する。

「C」：「抗体C」のエピトープと同一またはほぼ同一のエピトープであることを意味する。

「D」：「抗体D」のエピトープと同一またはほぼ同一のエピトープであることを意味する。

「-」：「抗体A」、「抗体B」、「抗体C」または「抗体D」のいずれ抗体のエピトープとも異なるエピトープであることを意味する。

「B/C」：「抗体B」のエピトープ及び/または「抗体C」のエピトープと同一またはほぼ同一のエピトープであることを意味する。

「A-/B」：「抗体A」のエピトープに近い位置のエピトープであり、且つ「抗体B」のエピトープと同一またはほぼ同一のエピトープであることを意味する。

上記以外の記載方法も、上記と同様な意味を有するものである。

【0179】

<4-15> 腎臓疾患及び組織繊維症に対する治療効果

本発明の抗ヒトCTGFヒトモノクローナル抗体の各種疾患に対する治療効果を当該疾患のマウスモデルを用いて調べた。

本試験で用いたマウスモデルは、下記の疾患あるいは病的状態のいずれにおいても見られる病理学的特徴の一部または臨床所見の一部を呈する疾患モデルであることから、本試験で得られる治療効果は、下記全ての疾患または病的状態の治療効果を代表するものである。

腎臓疾患（腎不全、腎炎、腎繊維症など）、各種組織繊維症（腎繊維症、肺繊維症、肝臓組織での繊維症、皮膚組織での繊維症など、関節リウマチに伴う滑膜組織での繊維症、各種癌に伴う繊維症）、皮膚疾患（強皮症、乾癬、アトピーなど）、肝臓疾患（肝硬変、肝臓組織での繊維症、肝炎など）、肺疾患（肺繊維症、肺炎など）、関節リウマチ、及び動脈硬化症など。

【0180】

＜4-15-1＞ 疾患マウスモデルの作製

B6C3F1マウス（雄、7週齢、各群6匹、SLC製）を、ペントバルビタール（Pentobarbital、50mg/kg）による麻酔下で外科手術により左脇腹を開腹した。次いで、左腎から伸びる尿管の2箇所を縫合糸で結紮し、当該2箇所の結紮部位の間の尿管を切断した（UUO、Unilateral ureteral obstruction）。当該処置の後、開腹部を縫合した。この手術により、当該左腎は、正常な腎臓の最も重要な機能である血液等の体液のろ過機能を失い、種々の腎疾患に見られる様々な病理的症状を発現するようになる。

【0181】

＜4-15-2＞ 抗CTGFモノクローナル抗体による治療効果

上記で作製した各々のモデルマウスに、リン酸緩衝液に溶解した抗ヒトCTGFヒトモノクローナル抗体M84またはM320（前記実施例で調製、各々5mg/kg）を腹腔内投与した。当該抗体投与は、上記手術完了直後に初回投与し、さらに初回投与から3日おきに合計4回行った。最終投与の後（当該手術完了から14日目）、各々のマウスから当該左腎を外科手術により摘出した。摘出した腎臓をアセトンで脱脂及び脱水した後、6N塩酸でタンパクを加水分解した。次いで、当該サンプルを温暖な条件下で窒素ガスを当て乾燥させた後、精製水に溶解して定量用のサンプルとした。得られた腎臓組織サンプル中のヒドロキシプロリン（OH-Proline）の濃度を既報の方法に従って測定した（Analytical Biochemistry, Vol.55, p.288-291, 1973; Kidney Int., Vol.54, No.1, p.99-109, 1998）。

該ヒドロキシプロリンの生成の上昇は、腎機能不全により惹起される腎炎及び腎繊維症の発症の指標であり、ヒドロキシプロリン濃度の低減は、該モノクローナル抗体が該腎臓疾患の治療に有効であることを示すものである。

【0182】

なお、前記と同様にして下記の対照実験を行った。

(1) 上述のUUO（尿管結紮処置）を施したマウスにリン酸緩衝液のみ（いずれの抗体も含まない）を前記と同様にして腹腔内投与した。

(2) 開腹のみ行いUUOを施さずに開腹部を縫合した正常マウスの場合。

(3) UUOを施さない正常マウスの場合。

(4) 前記抗体の代わりに腎繊維症などの繊維症治療薬として臨床試験中のPirfenidone (Kidney Int., Vol.54, No.1, p.99-109, 1998)（約500mg/kg）を餌に混入させて与えた場合（陽性対照試験）。

結果を、図17に示した。

この結果、本発明のモノクローナル抗体が、腎臓疾患並びに組織繊維症に対して有意な抑制及び治療効果を有していることが示された。

また驚くべきことに、本発明のモノクローナル抗体による有効性は、極めて高用量で投与した陽性対照薬（例えば、50kgの患者への4回投与の場合に換算すると約100g）の有効性と同様であった。

【0183】

<4-16> 抗ヒトCTGFヒトモノクローナル抗体の遺伝子配列及びアミノ酸配列の決定及び解析

前記実施例で作製された種々のヒトCTGFに対するヒトモノクローナル抗体を構成する重鎖（Heavy Chain）の可変領域をコードするcDNA配列、並びに軽鎖（Light Chain）の可変領域及び定常領域をコードするcDNA配列を下記のようにして決定するとともに、該遺伝子の構造的特徴を解析した。本実施例における配列解析の手順を図18に模式的に示した。

前記実施例で作製したヒトCTGFに対するヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ（クローン：A29、C26、C59、C114及びM295； 各々約 5×10^7 細胞）を培養後、遠心分離し、沈殿物を回収し、後述するPolyA⁺RNAの抽出時まで-80℃で保存した。

【0184】

各々のハイブリドーマからのPolyA⁺RNAの抽出、精製は、市販のFastTrack2.0k

得られたPolyA⁺RNAを鋳型とし、市販のMarathon cDNA Amplification Kit (CLONTECH製)を用いたRACE-PCR法により常法によりcDNAを合成した(「遺伝子増幅PCR法・基礎と新しい展開」、1992年第2刷、共立出版株式会社発行、p.13-15)。即ち、各々のハイブリドーマから精製したPolyA⁺RNA(1乃至5μg)を鋳型として、1st strand cDNA及び2nd strand cDNAを順次合成した。該cDNAを、フェノール/クロロホルム/イソアミノアルコール並びにクロロホルムを用いて各々1回ずつ抽出に供した。次いで、cDNAをエタノール沈殿させ、アダプターDNA(配列番号25)に連結させた。得られたDNA反応物を1/250に希釈したものを鋳型とし、合成プライマーを用いて常法によりPCRを行い抗体重鎖及び抗体軽鎖を各々コードするcDNAを調製した。抗体重鎖に係るPCRには、配列番号26に記載のプライマーを用いた。抗体軽鎖に係るPCRには、配列番号27に記載のプライマーを用いた。

各々のPCR産物をアガロースゲル電気泳動で分画し、DNAを回収した。得られた各々の c DNAの塩基配列の決定を、市販のDyeTerminator Cycle Sequencing FS Kit (PE-Applied Biosystems製) 及びPRISM377 DNA Sequencer (PE-Applied Biosystems製) を用いて行った。なお、本配列決定のためのSequencing Primerは、前述のPCRにおいて使用したプライマーを使用した。さらに、得られた配列から適切なSequencing Primerを作成しさらに反応を実施した。

107

をコードする cDNA 配列、並びに該各々の cDNA 配列から演繹されるアミノ酸配列
を下記のとおり配列表に示した。

【0187】

<クローン A29>

(重鎖の可変領域)

DNA 配列 : 配列番号 5 (シグナル配列 : 塩基番号 1 乃至 57、V 領域 : 塩
基番号 58 乃至 363)

アミノ酸配列 : 配列番号 6 (シグナル配列 : アミノ酸番号 1 乃至 19、可変領
域 : アミノ酸番号 21 乃至 120 を含む)

(軽鎖の可変領域)

DNA 配列 : 配列番号 15 (シグナル配列 : 塩基番号 1 乃至 60、V 領域 : 塩
基番号 61 乃至 365)

アミノ酸配列 : 配列番号 16 (シグナル配列 : アミノ酸番号 1 乃至 20、可変領
域 : アミノ酸番号 21 乃至 120 を含む)

【0188】

<クローン C26>

(重鎖の可変領域)

DNA 配列 : 配列番号 7 (シグナル配列 : 塩基番号 1 乃至 57、V 領域 : 塩
基番号 58 乃至 357)

アミノ酸配列 : 配列番号 8 (シグナル配列 : アミノ酸番号 1 乃至 19、可変領
域 : アミノ酸番号 21 乃至 118 を含む)

(軽鎖の可変領域)

DNA 配列 : 配列番号 17 (シグナル配列 : 塩基番号 1 乃至 60、V 領域 : 塩
基番号 61 乃至 364)

アミノ酸配列 : 配列番号 18 (シグナル配列 : アミノ酸番号 1 乃至 20、可変領
域 : アミノ酸番号 21 乃至 121 を含む)

【0189】

<クローン C59>

(重鎖の可変領域)

DNA配列 : 配列番号9 (シグナル配列: 塩基番号1乃至57、V領域: 塩基番号58乃至350)

アミノ酸配列: 配列番号10 (シグナル配列: アミノ酸番号1乃至19、可変領域: アミノ酸番号21乃至116を含む)

(軽鎖の可変領域)

DNA配列 : 配列番号19 (シグナル配列: 塩基番号1乃至66、V領域: 塩基番号67乃至353)

アミノ酸配列: 配列番号20 (シグナル配列: アミノ酸番号1乃至22、可変領域: アミノ酸番号23乃至117を含む)

【0190】

<クローンC114>

(重鎖の可変領域)

DNA配列 : 配列番号11 (シグナル配列: 塩基番号1乃至57、V領域: 塩基番号58乃至350)

アミノ酸配列: 配列番号12 (シグナル配列: アミノ酸番号1乃至19、可変領域: アミノ酸番号21乃至116を含む)

(軽鎖の可変領域)

DNA配列 : 配列番号21 (シグナル配列: 塩基番号1乃至47を含む、V領域: 塩基番号48乃至335)

アミノ酸配列: 配列番号22 (シグナル配列: アミノ酸番号1乃至16を含む、可変領域: アミノ酸番号17乃至111を含む)

【0191】

<クローンM295>

(重鎖の可変領域)

DNA配列 : 配列番号13 (シグナル配列: 塩基番号1乃至58、V領域: 塩基番号59乃至353)

アミノ酸配列: 配列番号14 (シグナル配列: アミノ酸番号1乃至19、可変領域: アミノ酸番号21乃至117を含む)

(軽鎖の可変領域)

DNA配列 : 配列番号23 (シグナル配列 : 塩基番号1乃至66、V領域 : 塩基番号67乃至356)

アミノ酸配列 : 配列番号24 (シグナル配列 : アミノ酸番号1乃至22、可変領域 : アミノ酸番号23乃至118を含む)

【0192】

決定された各々のDNA配列を基に、遺伝子配列解析ソフトウェアを用いて、Tomlinsonらにより作成されたヒトイムノグロブリンの可変領域遺伝子のライブラリーV BASE Sequence (Immunol. Today, Vol.16, No.5, p.237-242, 1995) を検索した。

その結果、上記ヒトモノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖の各々のV領域遺伝子は、各々下記のセグメントから構成されていることが分かった。

<重鎖V領域遺伝子>

クローンA29 :	DP-38
クローンC26 :	DP-75
クローンC59 :	DP-5
クローンC114 :	DP-5
クローンM295 :	DP-65

<軽鎖V領域遺伝子>

クローンA29 :	DPK24
クローンC26 :	DPK12
クローンC59 :	DPK1
クローンC114 :	DPK1
クローンM295 :	DPK9

なお、上記ヒトモノクローナル抗体の重鎖をコードするcDNA配列には、V領域と下流のD領域の間、並びにD領域とさらに下流のJ領域の間にN領域 (N-addition) を有しているものと考えられた。

【0193】

実施例5 ヒトCTGF及びマウスCTGFの定量のためのサンドイッチELISA系確立

<5-1> 抗体固定化マイクロプレートの作製

本実施例においてマイクロプレートに固定化するモノクローナル抗体は、前述のようにして調製した正常マウス由来のモノクローナル抗体8-64-6（国際寄託番号FERM BP-6209で識別されるハイブリドーマに由来する）を用いた。このモノクローナル抗体は、ヒトCTGFに高い反応性を有するとともに、マウスCTGFにも交叉反応性を示す。

モノクローナル抗体8-64-6をリン酸緩衝液で希釈し、 $1\mu\text{g}/50\mu\text{l}$ /ウェルの濃度で、ELISA用96穴マイクロプレート（コーニング（Corning）社製）の各ウェルに加え、室温で1時間インキュベートし、モノクローナル抗体8-64-6をマイクロプレートに吸着させた。

次いで、プレートをリン酸緩衝液で洗浄した後、各ウェルに3%のウシ血清アルブミン（BSA; Bovine serum albumin）を含有するリン酸緩衝液（ $200\mu\text{l}$ /ウェル）を加え、室温で2時間インキュベーションすることにより抗体が結合していない部位をブロックした。次いで、プレートをリン酸緩衝液で3回洗浄した。

【0194】

<5-2> 標識モノクローナル抗体の作製

本実施例において標識されるモノクローナル抗体は、前述のようにして調製した正常マウス由来のモノクローナル抗体8-86-2（国際寄託番号FERM BP-6208で識別されるハイブリドーマに由来する）を用いた。このモノクローナル抗体は、ヒトCTGF、マウスCTGF及びラットCTGFのいずれにも高い反応性を有する。

モノクローナル抗体8-86-2（ $20\text{mg}/\text{ml}$ を 1ml ）を、 0.1M の NaHCO_3 （ $\text{pH}8.2\sim 8.3$ ）溶液で、透析（ 4°C 、24時間）した。次いで、NHS-ビオチン（ $2\text{mg}/\text{ml}$ を $100\mu\text{l}$ 、ピアス社製）を加え、激しく攪拌した後、室温下で30分インキュベートした。次いで、リン酸緩衝液で透析（ 4°C 、24時間）した。

【0195】

<5-3> サンドイッチELISAによる定量法の確立

本発明で確立されたヒトCTGF及びマウスCTGFの定量のためのサンドイッチELISA系は以下の通りである。

実施例<5-1>で作製した抗体固定化マイクロプレートの各ウェルに、測定試料 (50 μ l/ウェル) を加え、室温で1時間インキュベートした。マイクロプレートを、0.1% Tween20を含有するリン酸緩衝液で3回洗浄後、各ウェルに、1% BSA、0.1% Tween20を含有するリン酸緩衝液で希釈した実施例<5-2>で作製したビオチン標識モノクローナル抗体 (0.3 μ l/50 μ l/ウェル) を加え、室温下で1時間インキュベートした。

マイクロプレートを、0.1% Tween20を含有するリン酸緩衝液で3回洗浄後、0.5MのNaClと20mMのHEPESからなる溶液 (BSA(1 mg/ml)を含有、pH7.0) で1000倍に希釈したストレプトアビジン- β -ガラクトシダーゼ (Streptoavidin- β -galactosidase、50 μ l、ギブコ (Gibco BRL) 社製) を各ウェルに加え、室温下で30分間インキュベートした。

【0196】

マイクロプレートを、0.1% Tween20を含有するリン酸緩衝液で3回洗浄後、100mMのNaCl、1mMのMgCl₂及び10mMのリン酸緩衝液 (Na及びKを含有) からなる溶液 (BSA(1mg/ml))を含有、pH7.0) で希釈した1%の4-メチルーウンベリフェリル- β -D-ガラクトシド (4-Methyl-umbelliferyl- β -D-galactoside、50 μ l、シグマ (Sigma) 社製) を各ウェルに加え、室温下で10分間インキュベートした。

各ウェルに、1MのNa₂CO₃ (100 μ l) を加え、反応を止めた。波長460nm (励起: 355nm) での蛍光強度をフルオロスキャンIIマイクロプレートフルオロメーター (Fluoroscanner II microplate fluorometer、フロー研究所 (Flow Laboratories Inc.) (製)) で測定した。測定試料中のヒトCTGFまたはマウスCTGF量は、下記実施例で作成した検量線から求めた。

【0197】

<5-4> 検量線の作成

実施例<4-8>で調製したアフィニティー精製した組換えヒトCTGFまたは組換えマウスCTGFをCTGF標準物質 (スタンダード) として用い、実施例<5-3>で確立したサンドイッチELISAを用いて検量線を作成した。結果を図19に示す。

ヒトCTGFについては、極めて低濃度である3 ng/ml~1000ng/mlの濃度範囲で有意差を持った検量線が得られた。マウスCTGFについては、30ng/ml~1000ng/mlの濃度範囲で有意差を持った検量線が得られた。しかしながら、実施例<5-3>で確立したサンドイッチELISA系では、ラットCTGFは定量できなかった。

【0198】

実施例6 マウスCTGF及びラットCTGFの定量のためのサンドイッチELISA系確立

<6-1> 抗体固定化マイクロプレートの作製

本実施例においてマイクロプレートに固定化するモノクローナル抗体は、前述のようにして調製した正常ラット由来のモノクローナル抗体13-51-2を用いた。このモノクローナル抗体は、マウスCTGFに高い反応性を有するとともに、ラットCTGFにも交叉反応性を示す。

モノクローナル抗体13-51-2をリン酸緩衝液(PBS)で希釈し、1 µg/50 µl/ウェルの濃度で、ELISA用96穴マイクロプレート(コーニング(Corning)社製)の各ウェルに加え、室温で1時間インキュベートし、モノクローナル抗体13-51-2をマイクロプレートに吸着させた。

次いで、プレートをリン酸緩衝液で洗浄した後、各ウェルに3%のウシ血清アルブミン(BSA; Bovine serum albumin)を含有するリン酸緩衝液(200 µl/ウェル)を加え、室温で2時間インキュベーションすることにより抗体が結合していない部位をブロックした。次いで、プレートをリン酸緩衝液で3回洗浄した。

【0199】

<6-2> 標識モノクローナル抗体の作製

実施例<5-2>で作製したビオチン標識モノクローナル抗体、即ち、ヒトCTGF、マウスCTGF及びラットCTGFのいずれにも高い反応性を有するモノクローナル抗体8-86-2(国際寄託番号FERM BP-6208で識別されるハイブリドーマに由来する)をビオチンで標識した標識モノクローナル抗体を用いた。

【0200】

<6-3> サンドイッチELISAによる定量法の確立

本発明で確立されたマウスCTGF及びラットCTGFの定量のためのサンドイッチELISA系は以下の通りである。

実施例<6-1>で作製した抗体固定化マイクロプレートの各ウェルに、測定試料 (50 μ l/ウェル) を加え、室温で1時間インキュベートした。マイクロプ

レートを、0.1% Tween20を含有するリン酸緩衝液で3回洗浄後、各ウェルに、1% BSA、0.1% Tween20を含有するリン酸緩衝液で希釈した実施例<6-2>で作製したビオチン標識モノクローナル抗体 (0.3 μ l/50 μ l/ウェル) を加え、室温下で1時間インキュベートした。

マイクロプレートを、0.1% Tween20を含有するリン酸緩衝液で3回洗浄後、0.5MのNaClと20mMのHEPESからなる溶液 (BSA (1 mg/ml) を含有、pH7.0) で1000倍に希釈したストレプトアビジン- β -ガラクトシダーゼ (Streptoavidin- β -galactosidase、50 μ l、ギブコ (Gibco BRL) 社製) を各ウェルに加え、室温下で30分間インキュベートした。

【0201】

マイクロプレートを、0.1% Tween20を含有するリン酸緩衝液で3回洗浄後、100mMのNaCl、1mMのMgCl₂及び10mMのリン酸緩衝液 (Na及びKを含有) からなる溶液 (BSA (1mg/ml)) を含有、pH7.0) で希釈した1%の4-メチルーウンベリフェリル- β -D-ガラクトシド (4-Methyl-umbelliferyl- β -D-galactoside、50 μ l、シグマ (Sigma) 社製) を各ウェルに加え、室温下で10分間インキュベートした。

各ウェルに、1MのNa₂CO₃ (100 μ l) を加え、反応を止めた。波長460nm (励起: 355nm) での蛍光強度をフルオロスキャンIIマイクロプレートフルオロメーター (Fluoroscan II microplate fluorometer、フロー研究所 (Flow Laboratories Inc.) (製)) で測定した。測定試料中のマウスCTGFまたはラットCTGF量は、下記実施例で作成した検量線から求めた。

【0202】

<6-4> 検量線の作成

実施例<4-8>で調製したアフィニティー精製した組換えマウスCTGFまたは組換えラットCTGFをCTGF標準物質 (スタンダード) として用い、実

施例<6-3>で確立したサンドイッチELISAを用いて検量線を作成した。結果を図20に示す。

マウスCTGFについては、極めて低濃度である1ng/ml~1000ng/mlの濃度範囲で有意差を持った検量線が得られた。ラットCTGFについては、10ng/ml~1000ng/mlの濃度範囲で有意差を持った検量線が得られた。しかしながら、実施例<6-3>で確立したサンドイッチELISA系では、ヒトCTGFは定量できなかった。

【0203】

実施例7 各種疾患に罹患している患者の血清中のCTGFの定量

実施例<5-3>で確立されたサンドイッチELISAによる定量法を用いて各種患者の血清中のCTGFを定量した。

【0204】

<7-1>胆道閉鎖症、リウマチ性血管炎、悪性慢性関節リウマチ、乾癬及びアトピー性皮膚炎

本試験で用いたヒト血清は、健常人（33検体）、胆道閉鎖症に罹患し、外科手術を受けた患者の術後サンプル（<第1群>臨床所見は正常な患者（17検体）、<第2群>症状進行中の患者（14検体）、及び<第3群>肝臓移植を必要とする重症患者（8検体））、リウマチ性血管炎に罹患している患者（10検体）、悪性慢性関節リウマチ（Malignant rheumatoid arthritis,MRA）に罹患している患者（17検体）、乾癬に罹患している患者（24検体）、及びアトピー性皮膚炎に罹患している患者（34検体）の各々から採取した血清である。

結果を図21（胆道閉鎖症）及び図22（リウマチ性血管炎、悪性慢性関節リウマチ、乾癬及びアトピー性皮膚炎）に示す。

胆道閉鎖症患者では、CTGFが第2群（症状進行期）で有意な発現することが明らかとなった。また、リウマチ性血管炎、悪性慢性関節リウマチでは、健常人に比べ有意に多くのCTGFを発現していることが明らかとなった。

【0205】

<7-2> 慢性関節リウマチ及び変形性関節症

本試験で用いたヒト血清は、慢性関節リウマチ（Rheumatoid arthritis,RA）

に罹患に罹患している患者（36名）及び変形性関節症（Osteoarthritis, OA）に罹患している患者（19名）の各々から採取した関節液である。

結果を図23に示す。

慢性関節リウマチ患者の関節液中のCTGF濃度は、変形性関節症のそれに比べ有意に高いことが明らかとなった。

この結果から、本発明のアッセイ系は、健常人のみならず種々の疾患患者でのCTGFの発現状態を高感度で定量することができ、その病状の進行程度を的確に把握するための臨床診断薬としての有用性を有していると言えることができる。

【0206】

実施例8 抗体フラグメントF(ab')₂及びFabの調製

前述のようにして調製した各種モノクローナル抗体の抗体フラグメントF(ab')₂及びFabは、下記のようにして調製する。

モノクローナル抗体（5mg/ml）を、20mMの酢酸ナトリウム緩衝液（pH3.5）に加え、37℃で30分間インキュベートする。次いで、不溶化ペプシン（1ml、ピアス社製）を加え、ローテーターで回転させながら37℃で12時間インキュベートする。反応液を回収し、遠心分離（3000rpm、10分間）し、上清を回収する。

プロテインAアフィニティークロマトグラフィーを、プロテインAカラムキット（アマシャム社製）のプロトコールに従って以下のようにして行う。遠心沈殿物に結合緩衝液を加え、遠心分離（3000rpm、10分間）し、上清を回収する。

2回の遠心分離で回収した上清を集め、等量の結合緩衝液を加え、さらに1Nの水酸化ナトリウムを加えてpH8.9に調整する。該混合溶液を、該結合緩衝液で平衡化した該プロテインAカラムに添加した後、該結合緩衝液（5ml）で2回洗浄し、溶出分画を回収する。得られた溶出分画を、5mMのリン酸緩衝液（2L、pH6.8）で透析（4℃、24時間）する。

【0207】

さらなる精製のためヒドロキシアパタイトカラム（バイオラッド社製）を用いて、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を行う。透析により得られる溶液を、該ヒドロキシアパタイトカラムに添加し、5mMのリン酸緩衝液を15分間流した

後、5mM～0.4Mのリン酸緩衝液で直線濃度勾配溶出させる。溶出液をフラクシオンコレクターで分取し、280nmでの吸光度を測定し、 $F(ab')_2$ を含む分画を回収する。得られた分画をリン酸緩衝液（2 L）で透析（4℃、24時間）し、モノクローナル抗体の精製 $F(ab')_2$ を得る。

【0208】

実施例9 ヒトCTGF発現トランスジェニックマウスの作製

実施例2で取得したヒトCTGFをコードするcDNAを、ニワトリ β アクチンプロモーターを有する発現ベクターpCAGGS (Gene, Vol.108, p.193-200, 1991) に、DNA末端平滑化キット（タカラ社製）を用いて挿入し、プラスミドphCTGFを得た。エレクトロポレーション法により、phCTGFでヒト腎臓由来線維芽細胞株293-T (ATCC CRL-1573) を形質転換した。実施例5で確立したサンドイッチELISAにより、得られた形質転換細胞が培養上清中にヒトCTGFを発現、分泌していることを確認した。

トランスジェニックマウス作製のために、phCTGFを制限酵素処理して直鎖状にした。

【0209】

仮親マウスには、白色ICRマウス（雌、日本エスエルシー社製）と精管結紮した白色ICRマウス（雄、日本エスエルシー社製）とを交配して得られたプラグ（または腔栓）を有する雌ICRマウスを用いた。また、ヒトCTGF遺伝子を導入するための受精卵を得るための採卵用マウスは、PEAMEX（5ユニット、三共ソーキ社製）及びプレグニール（5ユニット、オルガノン社製）を投与することにより過剰排卵させたBDF-1マウス（雌、日本エスエルシー社製）をBDF-1マウス（雄、日本エスエルシー社製）と交配させて作製した。交配後、BDF-1マウス（雌）から卵管部を摘出し、ヒアルロニダーゼ処理により受精卵のみを得、培地中で保存した。

【0210】

受精卵へのヒトCTGF遺伝子の導入は、顕微鏡下でマニピュレーターを用いて常法により行った。受精卵を保定針で固定し、37℃条件下、トリスEDTA緩衝液で希釈したヒトCTGFの前記直鎖状遺伝子を含有する溶液を、DNA導

入針を用いて受精卵の雄性前核内に注入した。

遺伝子導入後、正常な状態を保持する受精卵のみを選別し、仮親マウス（白色 ICR マウス）の卵巣内にある卵管采に、ヒト CTGF 遺伝子導入受精卵を挿入した。

仮親から生まれた子マウス（キメラマウス）の尾を切取りゲノム遺伝子を回収し、PCRによりマウスゲノム内にヒト CTGF 遺伝子が導入されていることを確認した。また、実施例 5 で確立したサンドイッチ ELISA により、該マウスの血清中にヒト CTGF が発現、分泌されていることを確認した。次いで、このキメラマウスを正常マウスと交配させることによりヒト CTGF 高発現ヘテロトランスジェニックマウスを作製した。該ヘテロマウス同士を掛け合わせるによりホモマウスを作製した。

【0211】

実施例 11 ラット CTGF の調製

<11-1> cDNA のクローニング

(1) ラット cDNA ライブラリー及びプローブの作製

ラット腎臓由来線維芽細胞株 NRK-49F (ATCC CRL-1570、約 1×10^6 /ml) を遠心 ($2,000 \times g$ 、5 分間、 $4^\circ C$) して、沈殿した細胞を ISOGEN (ニッポンジーン社製) を用いて懸濁させた後、クロロホルムで振とう抽出して上清を回収した。得られた上清にイソプロパノールを添加して室温で 10 分間放置した後、遠心 ($12,000 \times g$ 、10 分間、 $4^\circ C$) し、RNA を沈殿させた。沈殿した RNA をエタノールで洗浄した後、TE 緩衝液に溶解した。得られた全 RNA から、mRNA Purification Kit (Pharmacia 社製) を用いて poly(A)⁺ RNA を精製した。

【0212】

poly(A)⁺ RNA ($5 \mu g$) を鋳型とし、Superscript I system for cDNA Synthesis Kit (GIBCO-BRL 社製) を用いて cDNA を合成した。スクリーニングの効率を上げるため、NotI 切断部位を有する oligo dT プライマー (GIBCO-BRL 社製) を用いた。SalI アダプター付加した後 NotI 消化を行い、単一方向性を有する cDNA を得た。さらに cDNA サイズ分画カラム (cDNA size fractionation column、GIBCO-BRL 社製) を用いてサイズ分画を行った。

実施例 2 で取得したヒト及びマウス CTGF をコードする cDNA 塩基配列を比較しヒト・マウス間で相同性の高い領域を利用して 5' プライマー（配列番号 3）及び 3' プライマー（配列番号 4）を設計し、合成した。

【0213】

上記のようにして作製した cDNA ライブラリーを鋳型とし、前記両プライマー及び Ex Taq DNA ポリメラーゼ（宝酒造社製）を用いて PCR（Polymerase Chain Reaction）を行った。反応は、DNA サーマルサイクラー（Perkin Elmer Cetus 社製）を用いて、プライマー終濃度が $0.4 \mu\text{M}$ 及び Mg^{2+} 濃度が 1.5mM の条件下で、 94°C で 1 分、 55°C で 1 分及び 72°C で 1 分の反応を 1 サイクルとして合計 35 サイクル行った。増幅された DNA を、アガロースゲル電気泳動した後、QUIAEX DNA 抽出キット（QUIAEX DNA Extraction Kit、QUIAGEN 社製）を用いて精製した。

【0214】

回収した DNA 断片を TA クローニングキット（Invitrogen 社製）を用いてベクター pCRII（Invitrogen 社製）に連結した後、オートリードシーケンシングキット（Auto Read Sequencing Kit、Pharmacia 社製）及び A.L.F. DNA シーケンサー（Pharmacia 社製）を用いてジデオキシ法により塩基配列を決定した。得られた cDNA 断片の塩基配列を、実施例 2 及び実施例 3 で各々取得したヒト及びマウスの CTGF の塩基配列と比較した結果、当該 cDNA 断片はヒト及びマウスの CTGF のラットホモログ（ラット CTGF）をコードする領域を含んでいることが確認された。

該 cDNA 断片（約 0.8kb ）を、ECL ランダムプライムラベリングキット（ECL random prime labelling system、Amersham 社製）を用いて FITC 標識し、ブランクハイブリダイゼーション用プローブとして使用した。

【0215】

（2）cDNA ライブラリーのベクターへの組み込み及びパッケージング

前記（1）で得られた cDNA 断片を、ベクター lZipLox NotI-SalI arm（GIBCO-BRL 社製）に連結した。連結反応には DNA ライゲーションキット（DNA ligation Kit、宝酒造社製）を用いた。次いで、GIGA PACK II GOLD（Stratagene 社製）を用いてインビトロパッケージングした後、得られたファージ粒子を用いて、大

腸菌Y1090 (GIBCO-BRL社製) を宿主として、組み換えファージを含有するプラークからなる cDNA ライブラリーを作製した。

【0216】

(3) cDNA ライブラリーのスクリーニング

ラピッドハイブリダイゼーション緩衝液 (Rapid hybridization buffer、Amersham社製) を用いたプラークハイブリダイゼーション法 (マニアティス (Maniatis) ら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York) に従い、前記 (2) で調製した cDNA ライブラリーのスクリーニングを下記のようにして行った。

前記 (2) で得られたライブラリー (1×10^4 個プラーク) を寒天プレートに蒔き、ハイボンド-N ナイロンメンブラン (Hybond-N nylon membrane、Amersham社製) を用いてレプリカを作製した。このレプリカと前記 (1) で作製した FITC 標識プローブを用いて、ラピッドハイブリダイゼーション緩衝液 (Rapid hybridization buffer、Amersham社製) 中でプラークハイブリダイゼーションを行った。1 次スクリーニング及び 2 次スクリーニングを行い、13 個のポジティブ・クローンを得た。各クローンをシングルプラークで単離した後、GIBCO-BRL 社のマニュアルに従ってインビボエクサイジョン (in vivo Excision) に供し、13 クローンをプラスミド DNA として回収した。

【0217】

(4) 塩基配列決定

13 個のクローンについてオートリードシーケンシングキット (Auto Read Sequencing Kit、Pharmacia社製) と A.L.F. DNA シーケンサー (Pharmacia社製) を用いてジデオキシ法により塩基配列を決定した。13 個のクローンはすべて同じ塩基配列を含んでいた。ヒト及びマウス CTGF の cDNA 配列と比較した結果、得られたクローン r311 にはラット CTGF の全長をコードする cDNA 領域が含まれることが確認された。なお、得られらラット CTGF の全長 cDNA 配列 (5' 及び 3' 末端塩基配列を含む) を配列番号 1 に、またその配列から演繹されるアミノ酸配列を配列番号 2 に示す。

【0218】

<11-2> 組換えラットCTGFの調製

実施例<11-1>で取得したラットCTGFをコードするcDNAを含むクローンr311をSalI-DraIで消化して、ラットCTGFをコードするcDNAを含むDNA断片を切りだした。該DNA断片をプラスミドp cDNA3.1(-) (Invitrogen社製) に挿入し発現ベクターを作成した。エレクトロポレーションにより、該ベクターでヒト上皮様細胞株Hela (ATCC CCL-2) を形質転換した。形質転換細胞を、Geneticin (0.8mg/ml; GIBCO-BRL社製) 及び10%ウシ胎児血清 (fetal calf serum) を含有するRPMI1640培地中で約2週間培養することにより、Geneticin耐性形質転換細胞クローンを選別した。選別された形質転換細胞を、無血清培地ASF104 (味の素社製) 中培養し、組換えラットCTGFを発現させた。ラットCTGFの発現を、前記実施例4で調製したラットCTGFに交叉反応性を有するモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロッティングにより確認した。

培養培養上清を回収し、硫化アンモニウム沈澱法に供した後、ヘパリンカラムクロマトグラフィーに供し、0.3MのNaCl/PBSで洗浄した後、0.5MのNaCl/PBSで溶出し、部分精製ラットCTGF画分を得た。

【0219】

【発明の効果】

本発明は、未だ提供されていない、ヒト、マウス、ラット及びウサギ等の種々の哺乳動物のCTGFに対して、抗原特異性、抗原親和性、中和活性、及び交叉反応性等の性質の点で、異なる特性を有する種々の哺乳動物由来の種々のモノクローナル抗体を提供するものである。特に、遺伝子組換え技術を用いてヒトの抗体を産生するように作製したトランスジェニックマウスを免疫動物として用いることにより、ヒトCTGFに対する種々のヒトモノクローナル抗体を世界に先んじて初めて提供するものである。

【0220】

本発明のモノクローナル抗体の内、ヒトCTGFに対するモノクローナル抗体及びその医薬組成物は、その発症がCTGFに起因することが予測される可能性を有するような種々の疾患症状、例えば、腎疾患 (腎繊維症、腎炎、腎不全など)、肺疾患 (例えば、肺線維症、肺炎など)、肝臓疾患 (例えば、肝臓組織繊維

症、肝硬変、肝炎など）、皮膚疾患（例えば、創傷、強皮症、乾癬、ケロイドなど）、関節炎（例えば、慢性関節リウマチ、変形性関節症など）、血管疾患（例えば、リウマチ性血管炎など）、各種癌で併発する組織繊維症、及び動脈硬化症（特に、併発する組織繊維症）などの発症及び／または進行を抑制、阻止し、該疾患を治療または予防するための医薬品として有用である。

特に、ヒトモノクローナル抗体及びその医薬組成物は、マウス由来の抗体等の非ヒト哺乳動物由来の抗体からなる抗体医薬品の治療上の大きな問題点（副作用）であったヒトに対する抗原性を全く有しないことから、医薬品としての価値を劇的に増大させるものである。

【0221】

さらに、本発明の種々のモノクローナル抗体を用いることにより、種々哺乳動物（ヒト、マウス、ラット及びウサギ等）の体液（血清等）中のCTGFを、インタクトな状態で簡便かつ高感度で定量できる種々のイムノアッセイ系（方法及びキット）を提供することができる。また、該モノクローナル抗体を不溶性担体の固定化したアフィニティーカラムを作製することにより、種々の哺乳動物のCTGFを高純度で容易に精製することが可能となる。

【0222】

また、本発明のヒトCTGFを発現するトランスジェニック非ヒト哺乳動物（トランスジェニックマウス等）は、ヒトCTGFの生理学的機能を解明するためのモデル動物として有用であるだけでなく、ヒトCTGFの機能を制御（阻害、抑制、活性化、刺激など）する可能性を種々の医薬（低分子化合物、抗体、アンチセンス、ヒトCTGF以外のポリペプチドなど）をスクリーニングするためのツールといして極めて有用である。即ち、そのような薬剤を該トランスジェニック非ヒト哺乳動物に投与し、該動物中でのヒトCTGFの発現の程度を、本発明のアッセイ系（サンドイッチELISAなど）を用いて定量することにより、投与された薬剤のヒトCTGFに対する効果を評価することが可能である。

【0223】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Tobacco, Inc.

<120> Monoclonal Antibody For Connective Tissue Growth Factor
and Pharmaceutical Use Thereof

<130> J98-0215

<140>

<141>

<150> JP P1997-367699

<151> 1997-12-25

<160> 27

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 2338

<212> DNA

<213> Rat

<220>

<221> 5' UTR

<222> (1)..(212)

<220>

<221> CDS

<222> (213)..(1256)

<220>

<221> 3' UTR

<222> (1257)..(2338)

<220>

<221> polyA_signal

<222> (2297)..(2302)

<400> 1

ctccaagaag actcagccag acccactcca gctccgaccc taggagaccg acctcctcca 60

gacggcagca gccccagccc agtggacaac cccaggagcc accacctgga gcgtccggac 120

accaacctcc gccccgagac cgagtccagg ctccggccgc gcccctcgtc gcctctgcac 180

cccgtgtgc gtcctcctgc cgcgccccga cc atg ctc gcc tcc gtc gcg ggt 233

Met Leu Ala Ser Val Ala Gly

1

5

ccc gtt agc ctc gcc ttg gtg ctc ctc ctc tgc acc cgg cct gcc acc 281

Pro Val Ser Leu Ala Leu Val Leu Leu Leu Cys Thr Arg Pro Ala Thr

10

15

20

ggc cag gac tgc agc gcg cag tgt cag tgc gca cgt gaa gcg gcg ccg 329

Gly Gln Asp Cys Ser Ala Gln Cys Gln Cys Ala Arg Glu Ala Ala Pro

25

30

35

cgc tgc ccc gcc ggc gtg agc ctg gtg ctg gac ggc tgc ggc tgc tgc 377

Arg Cys Pro Ala Gly Val Ser Leu Val Leu Asp Gly Cys Gly Cys Cys

40

45

50

55

cgc gtc tgc gcc aag cag ctg gga gaa ctg tgc acg gag cgt gat ccc 425

Arg Val Cys Ala Lys Gln Leu Gly Glu Leu Cys Thr Glu Arg Asp Pro

60

65

70

tgc gac cca cac aag ggt ctc ttc tgc gac ttc ggc tcc ccc gcc aac 473

Cys Asp Pro His Lys Gly Leu Phe Cys Asp Phe Gly Ser Pro Ala Asn

75

80

85

cgc aag att ggc gtg tgc cct gcc aaa gat ggt gca ccc tgt gtc ttc 521

Arg Lys Ile Gly Val Cys Pro Ala Lys Asp Gly Ala Pro Cys Val Phe

90

95

100

ggt ggg tcc gtg tac cgc agc ggc gag tcc ttc caa agc agt tgc aaa 569

Gly Gly Ser Val Tyr Arg Ser Gly Glu Ser Phe Gln Ser Ser Cys Lys

105

110

115

tac cag tgc act tgc ctg gat ggg gcc gtg ggc tgt gtg ccc ctg tgc 617

Tyr Gln Cys Thr Cys Leu Asp Gly Ala Val Gly Cys Val Pro Leu Cys

120

125

130

135

agc atg gac gtg cgc ctg ccc agc cct gac tgc ccc ttc ccg aga agg 665

Ser Met Asp Val Arg Leu Pro Ser Pro Asp Cys Pro Phe Pro Arg Arg

140

145

150

gtc aag ctg ccc ggg aaa tgc tgt gag gag tgg gtg tgt gat gag ccc 713

Val Lys Leu Pro Gly Lys Cys Cys Glu Glu Trp Val Cys Asp Glu Pro
155 160 165

aag gac cgc aca gtg gtt ggc cct gcc cta gct gcc tac cga ctg gaa 761

Lys Asp Arg Thr Val Val Gly Pro Ala Leu Ala Ala Tyr Arg Leu Glu
170 175 180

gac aca ttt ggc cct gac cca act atg atg cga gcc aac tgc ctg gtc 809

Asp Thr Phe Gly Pro Asp Pro Thr Met Met Arg Ala Asn Cys Leu Val
185 190 195

cag acc aca gag tgg agc gcc tgt tct aag acc tgt ggg atg ggc atc 857

Gln Thr Thr Glu Trp Ser Ala Cys Ser Lys Thr Cys Gly Met Gly Ile
200 205 210 215

tcc acc cgg gtt acc aat gac aat acc ttc tgc agg ctg gag aag cag 905

Ser Thr Arg Val Thr Asn Asp Asn Thr Phe Cys Arg Leu Glu Lys Gln
220 225 230

agt cgt ctc tgc atg gtc agg ccc tgt gaa gct gac cta gag gaa aac 953

Ser Arg Leu Cys Met Val Arg Pro Cys Glu Ala Asp Leu Glu Glu Asn
235 240 245

att aag aag ggc aaa aag tgc atc cgg acg cct aaa att gcc aag cct 1001

Ile Lys Lys Gly Lys Lys Cys Ile Arg Thr Pro Lys Ile Ala Lys Pro
250 255 260

gtc aag ttt gag ctt tct ggc tgc acc agt gtg aag acc tac cgg gct 1049

Val Lys Phe Glu Leu Ser Gly Cys Thr Ser Val Lys Thr Tyr Arg Ala

265

270

275

aag ttc tgt ggg gtg tgc acg gac ggc cgc tgc tgc aca ccg cac aga 1097
Lys Phe Cys Gly Val Cys Thr Asp Gly Arg Cys Cys Thr Pro His Arg

280

285

290

295

acc acc aca ctg ccg gtg gag ttc aag tgc ccc gat ggc gag atc atg 1145
Thr Thr Thr Leu Pro Val Glu Phe Lys Cys Pro Asp Gly Glu Ile Met

300

305

310

aaa aag aac atg atg ttc atc aag acc tgt gcc tgc cat tac aac tgt 1193
Lys Lys Asn Met Met Phe Ile Lys Thr Cys Ala Cys His Tyr Asn Cys

315

320

325

ccc ggg gac aat gac atc ttt gag tcc ttg tac tac agg aag atg tat 1241
Pro Gly Asp Asn Asp Ile Phe Glu Ser Leu Tyr Tyr Arg Lys Met Tyr

330

335

340

gga gac atg gcg taa agccaggag taaggacac gaactcattt agactataac 1296
Gly Asp Met Ala

345

ttgaactgag ttacatctca ttttcttctg taaaaaaac aaaaagggtt acagtagcac 1356

attaatttaa atctgggttc ctaactgctg tgggagaaaa caccaccg aagtgagaac 1416

cgtgtgtcat tgtcatgcaa atagcctgtc aatctcagac actggtttcg agacagtitta 1476

gacttgacag ttgttacta gcgcacagtg acagaacgca cactaagggtg agcctcctgg 1536

aagagtggag atgccaggag aaagacaggt actagctgag gtcattttaa aagcagcgat 1596

atgcctactt tttggagtgt gacaggggag ggacattata gcttgcttgc agacagacct 1656

gctctagcaa gagctgggtg tgtgtcctcc actcggtag gctgaagcca gctattcttt 1716

cagtaagaac agcagtttca gcgctgacat tctgattcca gygacactgg tcgggagtca 1776

gaaccttgtc tattagactg gacagcttgt ggcaagtga tttgccggt acaagccaga 1836

tttttatgga tcttgtaa atgttgata aatatatata tttgtacagt tatctargtt 1896

aatttaaaga cgtttgtgcc tattgttctt gttttaagt cttttggaat ttttaactg 1956

atagcctcaa actccaaaca ccatcgatag gacataaagc ttgtctgtga ttcaaaacaa 2016

aggagatact gcagtggaaa ctgtaacctg agtgactgtc tgcagaaca tatggtacgt 2076

agacggtaaa gcaatggatc agaagtcaga tttctagtag gaaatgtaaa atcactgttg 2136

gcgaacaaat ggcctttatt aagaaatggc ttgctcagg taactgggtca gatttccacg 2196

aggaagtgtt tgctgcttct ttgactatga ctggtttggg aggcagttta tttgttgaga 2256

gtgtgaccaa aagttacatg tttgcacctt tctagttgaa aataaagtat atatattttt 2316

tatatgaaaa aaaaaaaaaa aa 2338

<210> 2

<211> 347

<212> PRT

<213> Rat

<400> 2

Met Leu Ala Ser Val Ala Gly Pro Val Ser Leu Ala Leu Val Leu Leu

1

5

10

15

Leu Cys Thr Arg Pro Ala Thr Gly Gln Asp Cys Ser Ala Gln Cys Gln

20

25

30

Cys Ala Arg Glu Ala Ala Pro Arg Cys Pro Ala Gly Val Ser Leu Val

35

40

45

Leu Asp Gly Cys Gly Cys Cys Arg Val Cys Ala Lys Gln Leu Gly Glu

50

55

60

Leu Cys Thr Glu Arg Asp Pro Cys Asp Pro His Lys Gly Leu Phe Cys

65

70

75

80

Asp Phe Gly Ser Pro Ala Asn Arg Lys Ile Gly Val Cys Pro Ala Lys

85

90

95

Asp Gly Ala Pro Cys Val Phe Gly Gly Ser Val Tyr Arg Ser Gly Glu

100

105

110

Ser Phe Gln Ser Ser Cys Lys Tyr Gln Cys Thr Cys Leu Asp Gly Ala

115

120

125

Val Gly Cys Val Pro Leu Cys Ser Met Asp Val Arg Leu Pro Ser Pro

130

135

140

Asp Cys Pro Phe Pro Arg Arg Val Lys Leu Pro Gly Lys Cys Cys Glu

145

150

155

160

Glu Trp Val Cys Asp Glu Pro Lys Asp Arg Thr Val Val Gly Pro Ala

165

170

175

Leu Ala Ala Tyr Arg Leu Glu Asp Thr Phe Gly Pro Asp Pro Thr Met

180

185

190

Met Arg Ala Asn Cys Leu Val Gln Thr Thr Glu Trp Ser Ala Cys Ser

195

200

205

Lys Thr Cys Gly Met Gly Ile Ser Thr Arg Val Thr Asn Asp Asn Thr

210

215

220

Phe Cys Arg Leu Glu Lys Gln Ser Arg Leu Cys Met Val Arg Pro Cys

225

230

235

240

Glu Ala Asp Leu Glu Glu Asn Ile Lys Lys Gly Lys Lys Cys Ile Arg

245

250

255

Thr Pro Lys Ile Ala Lys Pro Val Lys Phe Glu Leu Ser Gly Cys Thr

260

265

270

Ser Val Lys Thr Tyr Arg Ala Lys Phe Cys Gly Val Cys Thr Asp Gly
 275 280 285

Arg Cys Cys Thr Pro His Arg Thr Thr Thr Leu Pro Val Glu Phe Lys
 290 295 300

Cys Pro Asp Gly Glu Ile Met Lys Lys Asn Met Met Phe Ile Lys Thr
 305 310 315 320

Cys Ala Cys His Tyr Asn Cys Pro Gly Asp Asn Asp Ile Phe Glu Ser
 325 330 335

Leu Tyr Tyr Arg Lys Met Tyr Gly Asp Met Ala
 340 345

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
 synthesized primer sequence

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(20)

<400> 3

tgcggctgct gccgcgtctg

20

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
synthesized primer sequence

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(21)

<400> 4

gcacaggtct tgatgaacat c

21

<210> 5

<211> 444

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(444)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(57)

<220>

<221> V_region

<222> (58)..(363)

<400> 5

atg gag ttt ggg ctg agc tgg att ttc ctt gct gct att tta aaa ggt 48

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Ile Phe Leu Ala Ala Ile Leu Lys Gly

1 5 10 15

gtc cag tgt gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta aag 96

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys

20 25 30

cct ggg ggg tcc ctt aag acc tct cct gtg cag cct ctg gat tca act 144

Pro Gly Gly Ser Leu Lys Thr Ser Pro Val Gln Pro Leu Asp Ser Thr

35 40 45

ttc agt aac gcc tgg atg agc tgg gtc cgc cag gct cca gga agg ggc 192

Phe Ser Asn Ala Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly

50 55 60

tgg agt ggg ttg gcc gta tta aaa gca aaa ctg atg gtg gga cac aca 240

Trp Ser Gly Leu Ala Val Leu Lys Ala Lys Leu Met Val Gly His Thr

65 70 75 80

gac tac gct gca ccc gtg aaa ggc aga ttc acc atc tca aga gat gat 288
Asp Tyr Ala Ala Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp

85

90

95

tca aaa aac acg ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aaa acc gag gac 336
Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp

100

105

110

aca gcc gtg tat tac tgt acc aca aaa tgg gtg gct acg gac tac ttt 384
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Thr Lys Trp Val Ala Thr Asp Tyr Phe

115

120

125

gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca gcc tcc acc 432
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr

130

135

140

aag ggc cca tcg
Lys Gly Pro Ser
145

444

<210> 6

<211> 148

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Ile Phe Leu Ala Ala Ile Leu Lys Gly

特平 1 0 — 3 5 6 1 8 3

1

5

10

15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys

20

25

30

Pro Gly Gly Ser Leu Lys Thr Ser Pro Val Gln Pro Leu Asp Ser Thr

35

40

45

Phe Ser Asn Ala Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly

50

55

60

Trp Ser Gly Leu Ala Val Leu Lys Ala Lys Leu Met Val Gly His Thr

65

70

75

80

Asp Tyr Ala Ala Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp

85

90

95

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp

100

105

110

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Thr Lys Trp Val Ala Thr Asp Tyr Phe

115

120

125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr

130

135

140

Lys Gly Pro Ser

145

<210> 7

<211> 447

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(447)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(57)

<220>

<221> V_region

<222> (58)..(357)

<400> 7

atg gac tgg acc tgg agg atc tct ttc ttg gtg gca gca gcc aca gga 48

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Ser Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly

1 5 10 15

gcc cac tcc cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag 96

Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys

20 25 30

cct ggg gcc tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct ttc tgg cta cac ctt 144

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Trp Leu His Leu

35

40

45

tca ccc ggc tac tat atg cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg 192

Ser Pro Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly

50

55

60

ctt gag tgg atg gga tgg atc aac cct aac agt agt ggc aca cac tat 240

Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Ser Gly Thr His Tyr

65

70

75

80

gca cag atg ttt cag ggc agg gtc acc gtg acc agg gac acg tcc atc 288

Ala Gln Met Phe Gln Gly Arg Val Thr Val Thr Arg Asp Thr Ser Ile

85

90

95

agc aca gcc tac atg gag ctg agc agg ctg aga tct gac gac acg gcc 336

Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala

100

105

110

gtg tat tac tgt gcg aga gag ggg ata gca gca gct gcc atc tac ggt 384

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Ile Ala Ala Ala Ala Ile Tyr Gly

115

120

125

atg gac gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca gcc tcc 432

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

130

135

140

acc aag ggc cca tcg

447

Thr Lys Gly Pro Ser

145

<210> 8

<211> 149

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Ser Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly

1 5 10 15

Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys

20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Trp Leu His Leu

35 40 45

Ser Pro Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly

50 55 60

Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Ser Gly Thr His Tyr

65 70 75 80

Ala Gln Met Phe Gln Gly Arg Val Thr Val Thr Arg Asp Thr Ser Ile

85 90 95

Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala

100 105 110



120

125



135

140



<211> 438

<213> Homo sapiens

<221> CDS

<222> (1)..(438)

<221> sig_peptide

<222> (1)..(57)

<221> V_region

<222> (58)..(350)

atg gac tgc acc tgg agg atc ctc ttc ttg gtg gca gca gct aca ggc 48

Met Asp Cys Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly

1

5

10

15

acc cac gcc cag gtc cag ctg gta cag ttt ggg gct gag gtg aag aag 96

Thr His Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Phe Gly Ala Glu Val Lys Lys

20

25

30

cct ggg gcc tca gtg aag gtc tcc tgc aag gtt tcc gga tac acc ctc 144

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu

35

40

45

act gaa tta tcc atg cac tgg gtg cga cag gct cct gga aaa ggg ctt 192

Thr Glu Leu Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

50

55

60

gag tgg atg gga agt ttt gat cct gaa gat ggt gaa aca atc tac gca 240

Glu Trp Met Gly Ser Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala

65

70

75

80

cag aag ttc cag ggc aga gtc acc atg acc gag gac aca tct aca gac 288

Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp

85

90

95

aca gcc tac atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg 336

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val

100

105

110

tat tac tgt gca acc tct acg gtg gta act ccg tgg tac ttt gac tac 384

Tyr Tyr Cys Ala Thr Ser Thr Val Val Thr Pro Trp Tyr Phe Asp Tyr

115

120

125

tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca gcc tcc acc aag ggc 432

~~Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly~~

130

135

140

cca tcg

438

Pro Ser

145

<210> 10

<211> 146

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Asp Cys Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly

1

5

10

15

Thr His Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Phe Gly Ala Glu Val Lys Lys

20

25

30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu

35

40

45

Thr Glu Leu Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

50

55

60

Glu Trp Met Gly Ser Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala

65

70

75

80

~~Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp~~

85

90

95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val

100

105

110

Tyr Tyr Cys Ala Thr Ser Thr Val Val Thr Pro Trp Tyr Phe Asp Tyr

115

120

125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly

130

135

140

Pro Ser

145

<210> 11

<211> 438

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(438)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(57)

<220>

<221> V_region

<222> (58)..(350)

<400> 11

atg gac tgc acc tgg agg atc ttc ttc ttg gtg gca gca gct aca ggc 48

Met Asp Cys Thr Trp Arg Ile Phe Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly

1 5 10 15

acc cac gcc cag gtc cag ctg gta cag tct ggg gct gag gtg aag aag 96

Thr His Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys

20 25 30

cct ggg gcc tca gtg aag gtc tcc tgc aag gtt tcc gga tac acc ctc 144

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu

35 40 45

act gaa tta tcc atg cac tgg gtg cga cag gct cct gga aaa ggg ctt 192

Thr Glu Leu Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

50 55 60

gag tgg atg gga agt ttt gat cct gaa gat ggt gaa aca atc tac gca 240

Glu Trp Met Gly Ser Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala

65 70 75 80

cag aag ttc cag ggc aga gtc acc atg acc gag gac aca tct aca gac 288

Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp

85

90

95

~~aca gcc tac atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg~~ 336

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val

100

105

110

tat tac tgt gca acc tct acg gtg gta act ccg tgg tac ttt gac tac 384

Tyr Tyr Cys Ala Thr Ser Thr Val Val Thr Pro Trp Tyr Phe Asp Tyr

115

120

125

tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca gcc tcc acc aag ggc 432

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly

130

135

140

cca tcg

438

Pro Ser

145

<210> 12

<211> 146

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Met Asp Cys Thr Trp Arg Ile Phe Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly

1

5

10

15

Thr His Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys

20

25

30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu

35

40

45

Thr Glu Leu Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

50

55

60

Glu Trp Met Gly Ser Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala

65

70

75

80

Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp

85

90

95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val

100

105

110

Tyr Tyr Cys Ala Thr Ser Thr Val Val Thr Pro Trp Tyr Phe Asp Tyr

115

120

125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly

130

135

140

Pro Ser

145

<211> 450

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(450)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(58)

<220>

<221> V_region

<222> (59)..(353)

<400> 13

atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctt cct gct ggt ggc agc tcc cag atg 48

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Pro Ala Gly Gly Ser Ser Gln Met

1

5

10

15

ggt cct gtc cca ggt gca gct gca gga gtc ggg ccc agg act ggt gaa 96

Gly Pro Val Pro Gly Ala Ala Ala Gly Val Gly Pro Arg Thr Gly Glu

20

25

30

gcc ttc aca gac cct gtc ctc acc tgc act gtc tct ggt ggc tcc atc 144

Ala Phe Thr Asp Pro Val Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile

35

40

45

agc agt ggt ggt tac tac tgg agc tgg atc cgc cag cac cca ggg aag 192
 Ser Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys
 50 55 60

ggc ctg gag tgg att ggg tac atc tat tac agt ggg agc acc tac tac 240
 Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr
 65 70 75 80

aac ccg tcc ctc aag agt cga gtt acc ata tca gta gac acg tct aag 288
 Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys
 85 90 95

aac cag ttc tcc ctg aag ctg agc tct gtg act gcc gcg gac acg gcc 336
 Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
 100 105 110

gtg tat tac tgt gcg agc tat tac tat gat agt ggt ggt tat tac gac 384
 Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Tyr Tyr Tyr Asp Ser Gly Gly Tyr Tyr Asp
 115 120 125

tac ttt gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca gcc 432
 Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 130 135 140

tcc acc aag ggc cca tcg 450
 Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 145 150

<210> 14

<211> 150

<212> PRT

<213> ~~Homo sapiens~~

<400> 14

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Pro Ala Gly Gly Ser Ser Gln Met

1

5

10

15

Gly Pro Val Pro Gly Ala Ala Ala Gly Val Gly Pro Arg Thr Gly Glu

20

25

30

Ala Phe Thr Asp Pro Val Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile

35

40

45

Ser Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys

50

55

60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr

65

70

75

80

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys

85

90

95

Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala

100

105

110

Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Tyr Tyr Tyr Asp Ser Gly Gly Tyr Tyr Asp

115

120

125

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala

130

135

140

Ser Thr Lys Gly Pro Ser

145

150

<210> 15

<211> 423

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(423)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(60)

<220>

<221> V_region

<222> (61)..(365)

<400> 15

atg gtg ttg cag acc cag gtc ttc att tct ctg ttg ctc tgg atc tct 48

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser

1

5

10

15

ggt gcc tac ggg gac atc gtg atg acc cag tct cca gac tcc ctg gct 96

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala

20

25

30

gtg tct ctg ggc gag agg gcc acc atc aac tgc aag tcc agc cag act 144

Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Thr

35

40

45

gtt tta tac agc tcc aac aat aag aac tac tta gct tgg tac cag cag 192

Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln

50

55

60

aaa cca gga cag cct cct aag ctg ctc att tac tgg gca tct acc cgg 240

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg

65

70

75

80

gaa tcc ggg gtc cct gac cga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca gat 288

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp

85

90

95

ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag gct gac gat gtg gca gtt tat 336

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Asp Asp Val Ala Val Tyr

100

105

110

tac tgt cag caa tat tat agt act cct ccg tgg acg ttc ggc caa ggg 384

Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly

115

120

125

acc aag gtg gaa atc aaa cga act gtg gct gca cca tct

423

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser

130

135

140

<210> 16

<211> 141

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser

1

5

10

15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala

20

25

30

Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Thr

35

40

45

Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln

50

55

60

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg

65

70

75

80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp

85

90

95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Asp Asp Val Ala Val Tyr

100

105

110

~~Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly~~

115

120

125

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser

130

135

140

<210> 17

<211> 420

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(420)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(60)

<220>

<221> V_region

<222> (61)..(364)

<400> 17

atg aag gat ctg ctc agc ttc ctg ggg ctg cta atg ctc tgg ata cct 48



5

15

96

Gly Ser Ser Ala Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Phe Cys Pro

25

30

tca ccc ctg gac agc cga gcc tcc atc tcc tgc aag tct ggt ctg agc 144

Ser Pro Leu Asp Ser Arg Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Gly Leu Ser

40

45

ctc ctg cac agt gat gga aag acc tat ttg cat tgg tac ctg cag aag 192

Leu Leu His Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys

55

60

ccg ggc cag cct cca cag ctc ctg atc tat gag agt ttc caa ccg gtt 240

Pro Gly Gln Pro Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Ser Phe Gln Pro Val

70

75

80

ctc ctg gag tgc cag ata ggc tca gtg gca gcg ggt cag gac aga ttt 288

Leu Leu Gly Cys Gln Ile Gly Ser Val Ala Ala Gly Gln Asp Arg Phe

90

95

cag act gaa aat cag ccg ggt gga agg ctg agg aat gtt ggg gtt tat 336

His Thr Glu Asp Gln Pro Gly Gly Arg Leu Arg Asn Val Gly Val Tyr

105

110

tac tgc atg caa agt tta cag ctt ccg ctc act ttc ggc gga ggg acc 384

Tyr Cys Met Gln Ser Leu Gln Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr

115

120

125

aag gtg gag atc aaa cga act gtg gct gca cca tct

420

Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser

130

135

140

<210> 18

<211> 140

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Met Lys Asp Leu Leu Ser Phe Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Ile Pro

1

5

10

15

Gly Ser Ser Ala Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Phe Cys Pro

20

25

30

Ser Pro Leu Asp Ser Arg Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Gly Leu Ser

35

40

45

Leu Leu His Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys

50

55

60

Pro Gly Gln Pro Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Ser Phe Gln Pro Val

65

70

75

80

Leu Leu Glu Cys Gln Ile Gly Ser Val Ala Ala Gly Gln Asp Arg Phe



95

115 120 125

130

<213> Homo sapiens

<222> (1)..(405)

<222> (1)..(66)

<222> (67) .. (353)

<400> 19

atg gac atg agg gtc cct gct cag ctc ctg ggg ctc ctg ctg ctc tgg 48

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

1

5

10

15

ctc tca ggt gcc aga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc ttc 96

Leu Ser Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe

20

25

30

cct gtc tgc atc tgt agg aga cag agt cac cat cac ttg cca ggc gag 144

Pro Val Cys Ile Cys Arg Arg Gln Ser His His His Leu Pro Gly Glu

35

40

45

tca gga cat tca cca cta ttt aaa ttg gta tca gca gaa acc agg gaa 192

Ser Gly His Ser Pro Leu Phe Lys Leu Val Ser Ala Glu Thr Arg Glu

50

55

60

agc cct aag ctc ctg atc tac gat gca tcc aat ttg gaa aca ggg tcc 240

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Ser

65

70

75

80

cat cac ggt tca gtg gaa gtg gat ctg gga cag att tta ctt tca cca 288

His His Gly Ser Val Glu Val Asp Leu Gly Gln Ile Leu Leu Ser Pro

85

90

95

tca gca gcc tgc agc tct gaa gat att gca aca tat tac tgt caa cag 336

Ser Ala Ala Cys Ser Ser Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

100

105

110

tat aat aat ctc atc acc ttc ggc caa ggg aca cga ctg gag att aaa 384

Tyr Asn Asn Leu Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys

115

120

125

cga act gtg gct gca cca tct

405

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser

130

135

<210> 20

<211> 135

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

1

5

10

15

Leu Ser Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe

20

25

30

Pro Val Cys Ile Cys Arg Arg Gln Ser His His His Leu Pro Gly Glu

35

40

45

Ser Gly His Ser Pro Leu Phe Lys Leu Val Ser Ala Glu Thr Arg Glu

50

55

60

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Ser

65

70

75

80

His His Gly Ser Val Glu Val Asp Leu Gly Gln Ile Leu Leu Ser Pro

85

90

95

Ser Ala Ala Cys Ser Ser Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

100

105

110

Tyr Asn Asn Leu Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys

115

120

125

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser

130

135

<210> 21

<211> 387

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(387)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(47)

<223> Initiation codon and a portion of a signal
sequence are lacked.

<220>

<221> V_region

<222> (48)..(335)

<400> 21

gat agg gtc cta ggg gtc ctg atg gtt ggg ttt tcg gtg ccg gat gag 48

Asp Arg Val Leu Gly Val Leu Met Val Gly Phe Ser Val Pro Asp Glu

1 5 10 15

aac atc cag atg acc cag tat cca tct ccc tgt ctg cat acc tgt agg 96

Asn Ile Gln Met Thr Gln Tyr Pro Ser Pro Cys Leu His Thr Cys Arg

20 25 30

aga cag agt cac cat cac ttg cca gag cga gct cag gac att cac cac 144

Arg Gln Ser His His His Leu Pro Glu Arg Ala Gln Asp Ile His His

35 40 45

tat cta aat tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cta agc tct gat 192

Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Leu Ser Ser Asp

50 55 60

cta cga tgc atc caa ttt gga aac agg gtc cca tca cgg ttc agt gga 240

Leu Arg Cys Ile Gln Phe Gly Asn Arg Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

65 70 75 80

agt gga tct ggg aca gat tct act tca cca tca gca gcc tgc agc tct 288

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ser Thr Ser Pro Ser Ala Ala Cys Ser Ser

85 90 95

gaa gat att gca aca tat tac tgt caa cag tat aat aat ctc atc acc 336

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Leu Ile Thr

100

105

110

ttc ggc caa ggg aca cga ctg gag att aaa cga act gtg gct gca cca 384

Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro

115

120

125

tct

387

Ser

<210> 22

<211> 129

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Asp Arg Val Leu Gly Val Leu Met Val Gly Phe Ser Val Pro Asp Glu

1

5

10

15

Asn Ile Gln Met Thr Gln Tyr Pro Ser Pro Cys Leu His Thr Cys Arg

20

25

30

Arg Gln Ser His His His Leu Pro Glu Arg Ala Gln Asp Ile His His

35

40

45

Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Leu Ser Ser Asp

50

55

60

Leu Arg Cys Ile Gln Phe Gly Asn Arg Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
65 70 75 80

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ser Thr Ser Pro Ser Ala Ala Cys Ser Ser
85 90 95

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Leu Ile Thr
100 105 110

Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
115 120 125

Ser

<210> 23

<211> 411

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(411)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(66)

<220>

<221> V_region

<222> (67)..(356)

<400> 23

atg gac atg agg gtc cct gct cag ctc ctg ggg ctc ctg ctg ctc tgg 48

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

ctc tca ggt gcc aga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc 96

Leu Ser Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser

20 25 30

ctg tct gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt 144

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser

35 40 45

cag agc att agc agc tat tta aat tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa 192

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys

50 55 60

gcc cct aag ctc ctg att tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg tcc 240

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Ser

65 70 75 80

cat caa ggt tca gtg gca gtg gat tat gcg aca gat ttc cat ttc tca 288

His Gln Gly Ser Val Ala Val Asp Tyr Ala Thr Asp Phe His Phe Ser

85 90 95

cca tca gca gtt tgc cac ctg acg att ttg caa ctt act act gtc cac 336

Pro Ser Ala Val Cys His Leu Thr Ile Leu Gln Leu Thr Thr Val His

100

105

110

aga gtt aca gta tcc cat tca ctt tcg gcc ctg ggg acc aaa gtg gat 384

Arg Val Thr Val Ser His Ser Leu Ser Ala Leu Gly Thr Lys Val Asp

115

120

125

agc aaa cga act gtg gct gca cca tct

411

Ser Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser

130

135

<210> 24

<211> 137

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp

1

5

10

15

Leu Ser Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser

20

25

30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser

35

40

45

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
50 55 60

~~Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Ser~~
65 70 75 80

His Gln Gly Ser Val Ala Val Asp Tyr Ala Thr Asp Phe His Phe Ser
85 90 95

Pro Ser Ala Val Cys His Leu Thr Ile Leu Gln Leu Thr Thr Val His
100 105 110

Arg Val Thr Val Ser His Ser Leu Ser Ala Leu Gly Thr Lys Val Asp
115 120 125

Ser Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser
130 135

<210> 25

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
synthesized adaptor sequence

<220>

<221> misc_difference

<222> (1)..(27)

<400> 25

ccatcctaatac gactcact atagggc

27

<210> 26

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
synthesized primer sequence

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(25)

<400> 26

ccagggccgc tgtgctctcg gaggt

25

<210> 27

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
synthesized primer sequence

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(23)

<400> 27

gggggtcagg ctggaactga gga

23

【0224】

「配列表フリーテキスト」

配列番号：3

他の情報：人工配列についての記載：人工的に合成したプライマー配列。

配列番号：4

他の情報：人工配列についての記載：人工的に合成したプライマー配列。

配列番号：21

他の情報：開始コドン及びシグナル配列の一部が欠けている。

配列番号：25

他の情報：人工配列についての記載：人工的に合成したアダプター配列。

配列番号：26

他の情報：人工配列についての記載：人工的に合成したプライマー配列。

配列番号：27

他の情報：人工配列についての記載：人工的に合成したプライマー配列。

【0225】

【図面の簡単な説明】

【図1】

ヒトCTGFまたはマウスCTGFを各種哺乳動物に免疫して調製した各種の

モノクローナル抗体の特性を示す図。

【図2】

ヒトCTGFをヒト抗体産生トランスジェニックマウスに免疫して調製した各種のヒトモノクローナル抗体の特性を示す図。

【図3】

ヒト、マウス及びラットのいずれのCTGFにも反応性を有するモノクローナル抗体8-86-2を吸着させたアフィニティーカラムを用いて精製した組換えヒトCTGF、組換えマウスCTGF及び組換えラットCTGFのSDSポリアクリルアミドゲルでの電気泳動の状態を示す図。

【図4】

ヒト、マウス及びラットのいずれのCTGFにも反応性を有するモノクローナル抗体8-86-2を吸着させたアフィニティーカラムを用いて精製した組換えヒトCTGF、組換えマウスCTGF及び組換えラットCTGFの、ラット腎臓由来線維芽細胞NRK-49Fの細胞増殖促進活性を示す図。

縦軸は細胞増殖促進活性の強弱の指標としての $[^3\text{H}]$ チミジンの細胞内への取込み量を示し、横軸は各々の組換えCTGFの濃度を示す。

【図5】

ヒトCTGFまたはマウスCTGFを各種哺乳動物に免疫して調製した各種のモノクローナル抗体のヒトCTGFに対する反応性を示す図。

縦軸は抗体の反応性の指標となる蛍光強度を示し、横軸は各種濃度のヒトCTGFにおけるELISAで試験したモノクローナル抗体のクローン名を示す。

【図6】

ヒトCTGFまたはマウスCTGFを各種哺乳動物に免疫して調製した各種のモノクローナル抗体のマウスCTGFに対する反応性を示す図。

縦軸は抗体の反応性の指標となる蛍光強度を示し、横軸は各種濃度のマウスCTGFにおけるELISAで試験したモノクローナル抗体のクローン名を示す。

【図7】

ヒトCTGFまたはマウスCTGFを各種哺乳動物に免疫して調製した各種のモノクローナル抗体のラットCTGFに対する反応性を示す図。

縦軸は抗体の反応性の指標となる蛍光強度を示し、横軸は各種濃度のラットCTGFにおけるELISAで試験したモノクローナル抗体のクローン名を示す。

【図 8】

ヒトCTGFをヒト抗体産生トランスジェニックマウスに免疫して調製した各種のヒトモノクローナル抗体のヒトCTGFに対する反応性を示す図。

縦軸は抗体の反応性の指標となる蛍光強度を示し、横軸は各種濃度のヒトCTGFにおけるELISAで試験したヒトモノクローナル抗体のクローン名を示す。

【図 9】

ヒトCTGFをヒト抗体産生トランスジェニックマウスに免疫して調製した各種のヒトモノクローナル抗体のマウスCTGFに対する反応性を示す図。

縦軸は抗体の反応性の指標となる蛍光強度を示し、横軸は各種濃度のマウスCTGFにおけるELISAで試験したヒトモノクローナル抗体のクローン名を示す。

【図 10】

ヒトCTGFをヒト抗体産生トランスジェニックマウスに免疫して調製した各種のヒトモノクローナル抗体のラットCTGFに対する反応性を示す図。

縦軸は抗体の反応性の指標となる蛍光強度を示し、横軸は各種濃度のラットCTGFにおけるELISAで試験したヒトモノクローナル抗体のクローン名を示す。

【図 11】

ヒト腎臓由来線維芽細胞株293-TとヒトCTGFまたはマウスCTGFとの接着に対する、ヒトCTGFまたはマウスCTGFを各種哺乳動物に免疫して調製した各種のモノクローナル抗体の阻害活性を示す図。

縦軸は阻害活性の指標となる蛍光強度を示し、横軸は試験した各種モノクローナル抗体のクローン名を示す。

【図 12】

ラット腎臓由来線維芽細胞株NRK-49FとヒトCTGFの接着に対する、ヒトCTGFをヒト抗体産生トランスジェニックマウスに免疫して調製した各種のヒトモノクローナル抗体の阻害活性を示す図。

縦軸は細胞結合率(%)を示し、横軸は試験した各種モノクローナル抗体のクローン名を示す。なお、加えた細胞の総数を100%とした。

【図 13】

ラット腎臓由来繊維芽細胞株NRK-49F、ヒト骨肉腫由来細胞株MG-63またはヒト肺由来繊維芽細胞の各々とヒトCTGFの接着に対する、ヒトCTGFをヒト抗体産生トランスジェニックマウスに免疫して調製した各種のヒトモノクローナル抗体の阻害活性を示す図。

縦軸は細胞結合率(%)を示し、横軸は試験した各種モノクローナル抗体のクローン名を示す。なお、加えた細胞の総数を100%とした。

【図 14】

ヒトCTGFまたはマウスCTGFを各種哺乳動物に免疫して調製した各種のモノクローナル抗体の動脈硬化症モデルウサギWHHLの動脈硬化巣組織切片への反応性を示す該組織の染色状態を示す図。

分図(a)は対照試験での染色状態を示し、分図(b)はモノクローナル抗体B35.1での試験での染色状態を示し、分図(c)はモノクローナル抗体B29.6での試験での染色状態を示し、分図(d)はモノクローナル抗体13-51-2での試験での染色状態を示し、分図(e)はモノクローナル抗体A4.3での試験での染色状態を示し、分図(f)はモノクローナル抗体C114.4での試験での染色状態を示し、分図(g)はモノクローナル抗体A11.1での試験での染色状態を示し、分図(h)はモノクローナル抗体A29.6での試験での染色状態を示し、また分図(i)はモノクローナル抗体C26.11での試験での染色状態を示す。

【図 15】

精製ヒトCTGFの刺激によるラット腎臓由来繊維芽細胞株NRK-49Fの細胞増殖に対する、ヒトCTGFをヒト抗体産生トランスジェニックマウスに免疫して調製した各種のヒトモノクローナル抗体の阻害活性を示す図。

縦軸は細胞増殖促進活性の強弱の指標としての $[^3\text{H}]$ チミジンの細胞内への取込み量を示し、横軸は各種濃度の精製ヒトCTGFを用いて試験したヒトモノクローナル抗体のクローン名を示す。

【図 16】

精製ヒトCTGFの刺激によるラット腎臓由来繊維芽細胞株NRK-49Fの細胞増殖に対する、ヒトCTGFをヒト抗体産生トランスジェニックマウスに免疫して調製

した各種のヒトモノクローナル抗体の阻害活性を示す図。

縦軸は細胞増殖促進活性の強弱の指標としての $[^3\text{H}]$ チミジンの細胞内への取込み量を示し、横軸は各種濃度の精製ヒトCTGFを用いて試験したヒトモノクローナル抗体のクローン名を示す。

【図 17】

ヒトCTGFをヒト抗体産生トランスジェニックマウスに免疫して調製した各種のヒトモノクローナル抗体の、腎臓疾患及び組織繊維症に対する治療効果を示す図。

縦軸は、疾患症状の進行の指標となるヒドキシプロリンの濃度を示し、横軸は投与したヒトモノクローナル抗体のクローン名を示す。

【図 18】

抗ヒトCTGFヒトモノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖の各々をコードするDNA配列の決定の手順を模式的に示す図。

【図 19】

モノクローナル抗体8-64-6及び8-86-2を用いたサンドイッチELISAにより定量した標準ヒトCTGF、標準マウスCTGF及び標準ラットCTGFの検量線を示す図。

縦軸は蛍光強度を示し、横軸は標準CTGFの濃度を示す。

【図 20】

モノクローナル抗体13-51-2及び8-86-2を用いたサンドイッチELISAにより定量した標準ヒトCTGF、標準マウスCTGF及び標準ラットCTGFの検量線を示す図。

縦軸は蛍光強度を示し、横軸は標準CTGFの濃度を示す。

【図 21】

モノクローナル抗体8-64-6及び8-86-2を用いたサンドイッチELISAにより定量した胆道閉鎖症患者の各種血清検体中に含まれるCTGF濃度を示す図。

縦軸は定量値（CTGF含量）を示し、横軸は試験した検体群の種類を示す。なお、第1群（I）は臨床所見は正常な患者の検体であり、第2群（II）は症状進行中の患者の検体であり、また第3群（III）は肝臓移植を必要とする重症患

者の検体である。

【図 2 2】

モノクローナル抗体8-64-6及び8-86-2を用いたサンドイッチELISAにより定量した各種患者の血清検体中に含まれるCTGF濃度を示す図。

縦軸は定量値（CTGF含量）を示し、横軸は試験した検体を採取した患者が罹患している疾患名を示す。

【図 2 3】

モノクローナル抗体8-64-6及び8-86-2を用いたサンドイッチELISAにより定量した慢性関節リウマチ患者及び変形性関節症患者の関節液検体中に含まれるCTGF濃度を示す図。

縦軸は定量値（CTGF含量）を示し、横軸は試験した検体を採取した患者が罹患している疾患名を示す。

【書類名】 図面

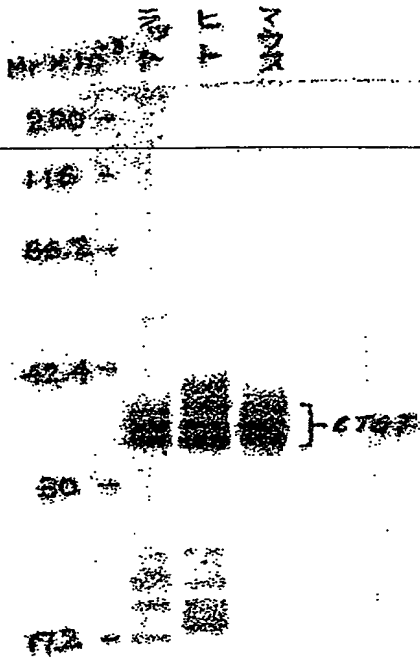
【図 1】

クローン名	免疫原動物	抗原	アイソタイプ	交叉反応性			HLL ウサギの 動脈硬化系組織 への反応性	293細胞の 融合阻害活性
				ヒト	マウス	ラット		
A4.3	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	G2・K	OOO	OOO	OOO	O	O
A11.1	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	G2・K	OOO	OOO	OXX	O	O
A15.1	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	G2・K	OOO	OAX	XXX		O
A29.6	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	G2・K	OOO	OXX	XXX	O	O
B13.7	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	G2・K	OOO	OOO	ΔXX		X
B22.2	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	G2・K	OOO	OOO	OOO		X
B29.6	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	G2・K	OOO	OOO	OOO	X	X
B35.1	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	G2・K	OOO	OOO	OOO	X	O
C2.1	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	G2・K	OAX	OXX	ΔXX		X
C26.11	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	G2・K	OOO	OOO	OOO	O	O
C59.1	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	G2・K	OOO	OOO	OOO		X
C114.4	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	G2・K	OOO	OOO	OXX	O	O
8-64-6	正常マウス	ヒト CTGF	G1・K	OOO	OXX	OAX	X	O
8-86-2	正常マウス	ヒト CTGF	G1・K	OOO	OOO	OOO		O
8-97-3	正常マウス	ヒト CTGF	G1・K	OOO	OOO	OOO		O
8-149-3	正常マウス	ヒト CTGF	G1・K	OOO	OXX	OAX	X	O
15-38-1	正常マウス	ヒト CTGF	G1・K	OOO	OOO	OOO		X
13-51-2	正常ラット	マウス CTGF		XXX	OOO	OOO	O	
17-132	正常ラット	マウス CTGF		OOO	OOO	OAX		O
23-96	正常ラット	マウス CTGF		XXX	OOO	OXX		X
24-53	正常ラット	マウス CTGF		OOO	OOO	OOO		X
24-67	正常ラット	マウス CTGF		OOO	OOO	OOO		X
25-91	正常ラット	マウス CTGF		XXX	OOO	OOO		X
25-101	正常ラット	マウス CTGF		XXX	OOO	ΔXX		X
25-256	正常ラット	マウス CTGF		XXX	OOO	OAX		X
25-338	正常ラット	マウス CTGF		XXX	OOO	OOO		X
25-410	正常ラット	マウス CTGF		XXX	OOO	OAX		X
25-463	正常ラット	マウス CTGF		XXX	OOO	OAX		X
2-228-1	正常ハムスター	マウス CTGF		OOO	OOO	OOO		O

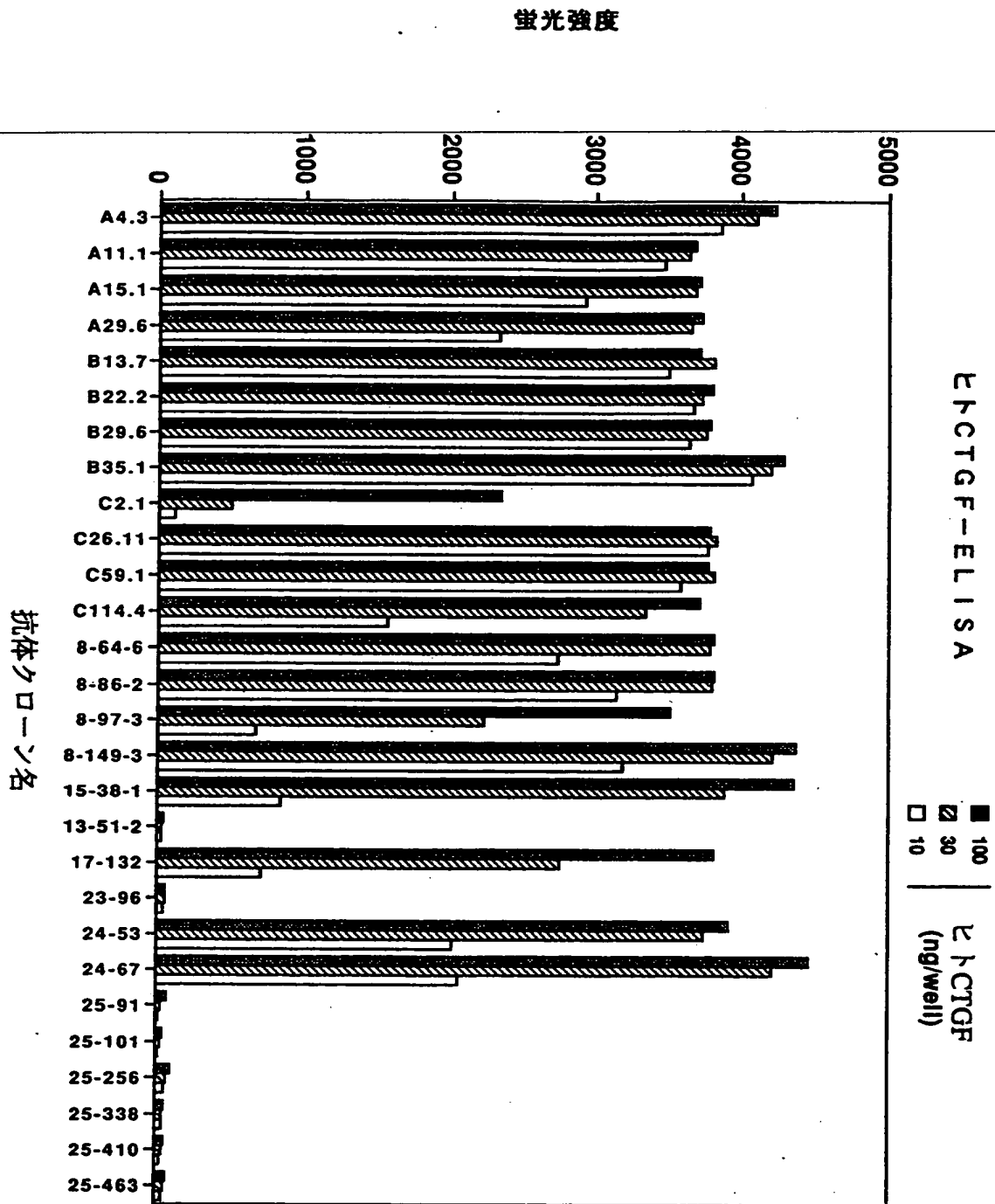
【図 2】

クローン名	被免疫動物	抗原	γ/δタイプ	交叉反応性			エピトープ マッピング	NRK 細胞の 結合阻害活性	NRK 細胞の 増殖阻害活性
				ヒト CTGF	マウス CTGF	ラット CTGF			
A4.3	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ	○○△	○○△	○○×	A	×	○
A11.1	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ	○○○	○○△	○△×	(B)		
A15.1	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ	○○△	○××	×××	B		○
A29.6	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ	○○○	○○○	○△×	B	×	○
B13.7	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ	○○△	○○×	○××	B		○
B22.2	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ	○○△	○○△	○○△	—	×	○
B29.6	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ	○○△	○○△	○○×	—		○
B35.1	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ	○○△	○○×	○××	B/C	○	○
C26.11	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ	○○△	○○×	○××	B(C)		○
C59.1	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ	○○×	○○×	○△×	(D)	○	○
C114.4	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ	○○×	○○×	○△×	D	○	○
M32.2	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ	○○△	○△×	△××	A-/B/C		○
M33.3	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ	○○△	○○△	○○△	A-/B		○
M84.4	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ	○○△	○△×	△××	A-/B/C	×	○
M107.2	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ	○○△	○○△	○△×	B		○
M122	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ				D		○
M124.6	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ	○○△	○○△	○○△	B		○
M194.2	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ	○○△	○○△	○△×	A-/B	×	○
M244	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ				B		○
M255	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ				D		○
M268.1	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ	○○×	○○△	○○×	B		○
M288.5	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ	○××	○△×	○××	A-/B		○
M291.2	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ	○○×	○△×	○××	D		○
M295.2	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ	○○○	○○○	○○△	B	×	○
M315	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ				B/C	○	○
M320.2	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ				B	×	○
N45.2	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ	○○△	○○×	○△×	A-/B	×	○
N50.1	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ	○○×	○○×	○△×	A-/B		○
N60.1	ヒト抗体産生マウス	ヒト CTGF	IgG2/κ	○○△	○○×	○△×	B/C	×	○

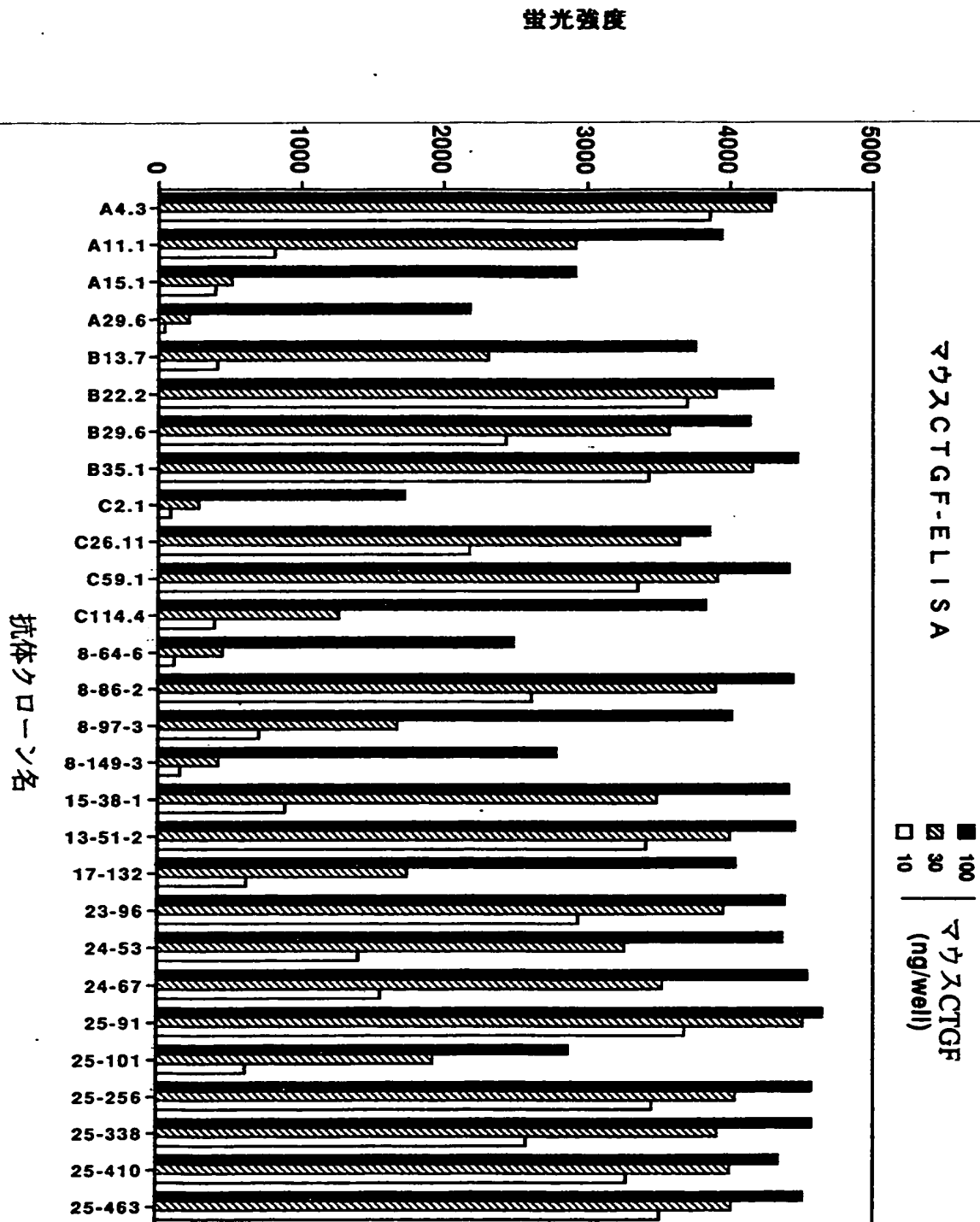
【図3】



【図5】

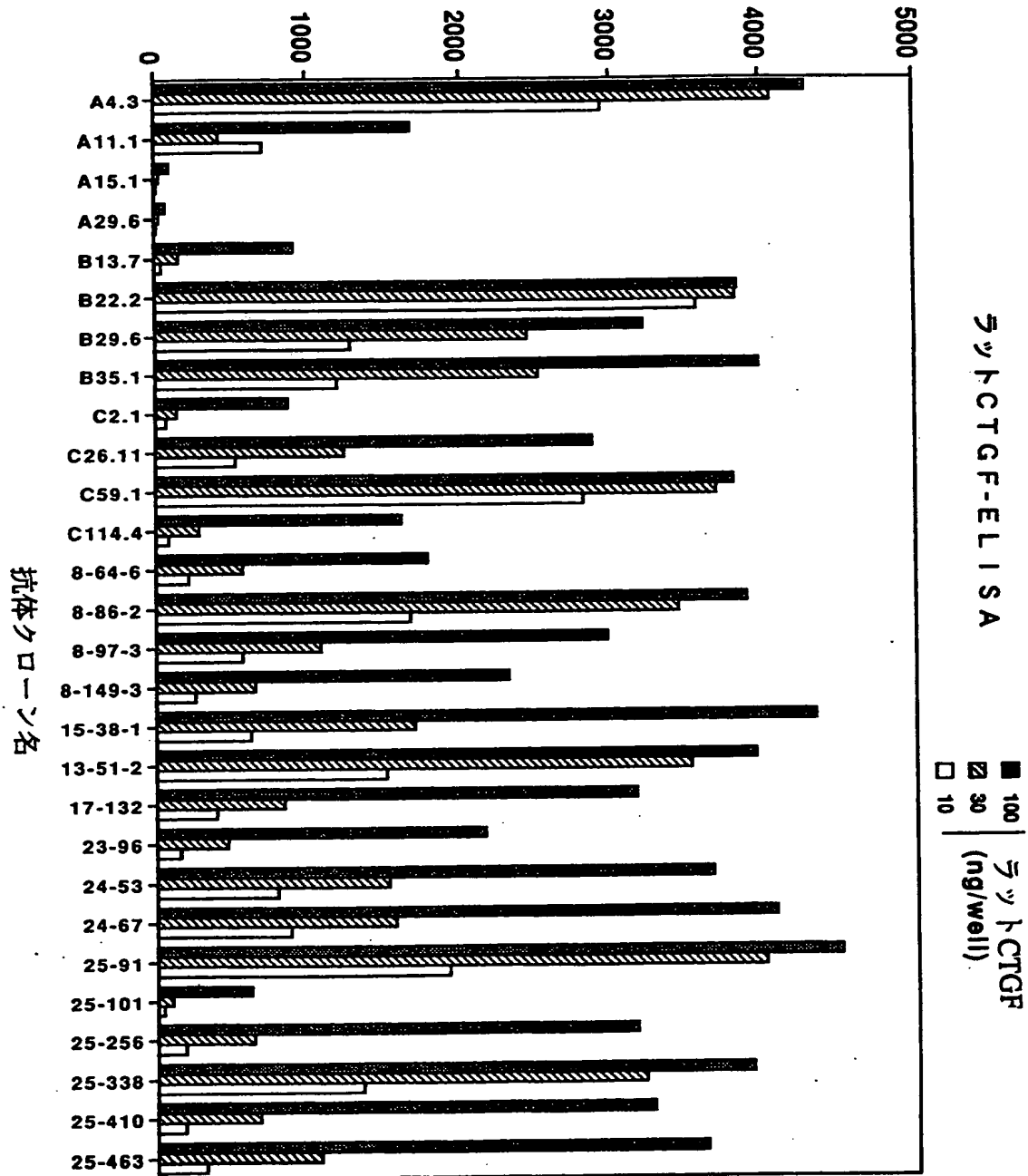


【図6】

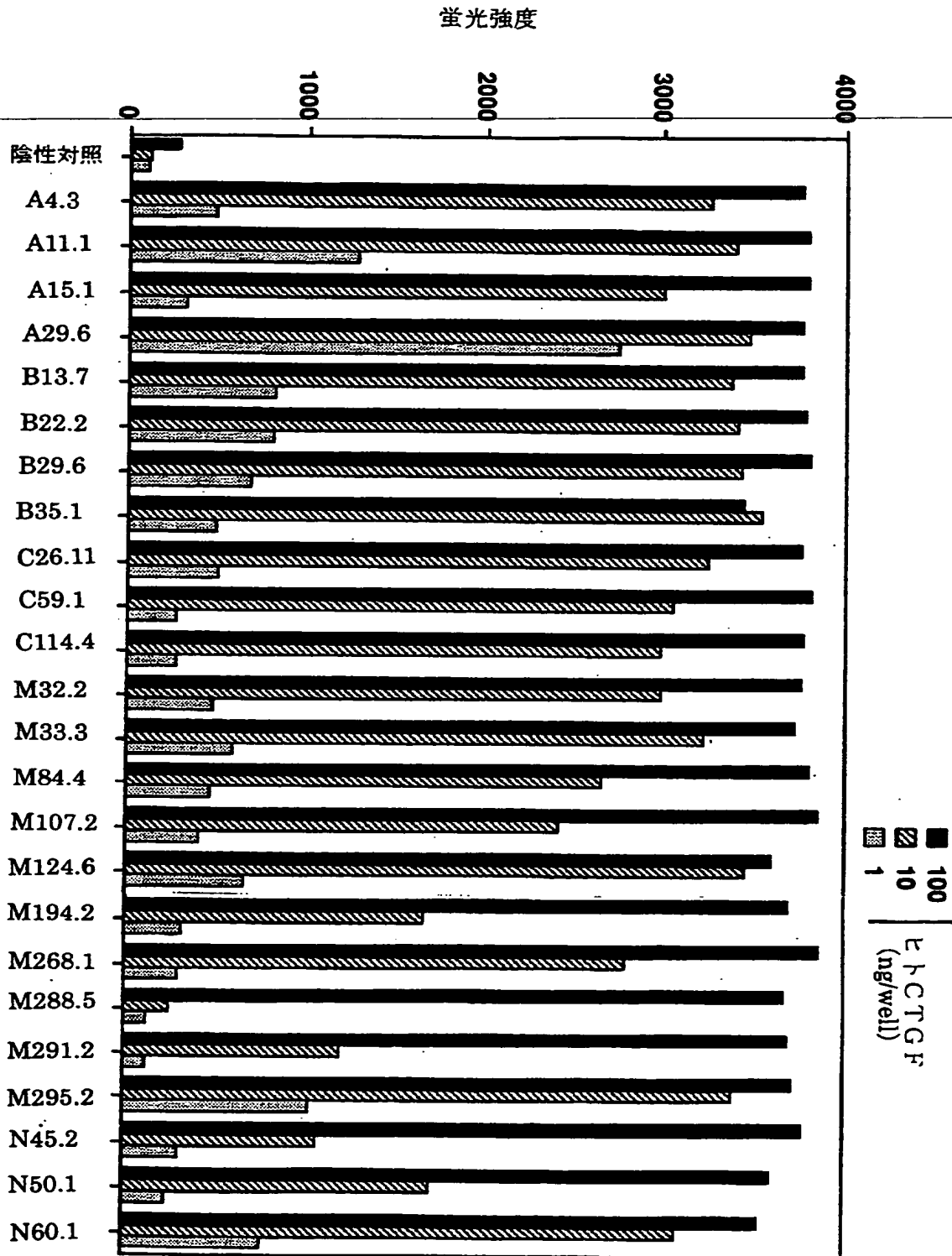


【図7】

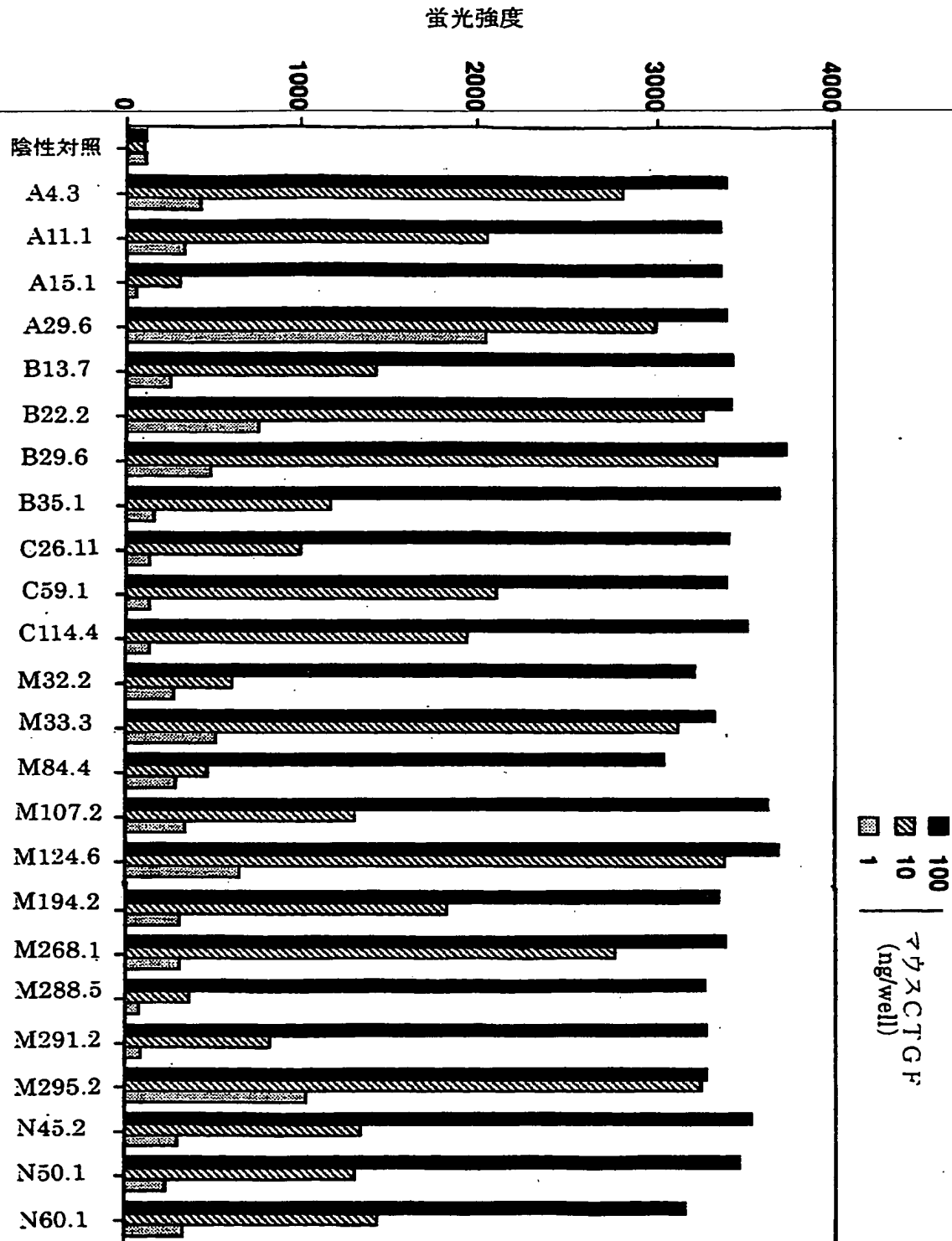
蛍光強度



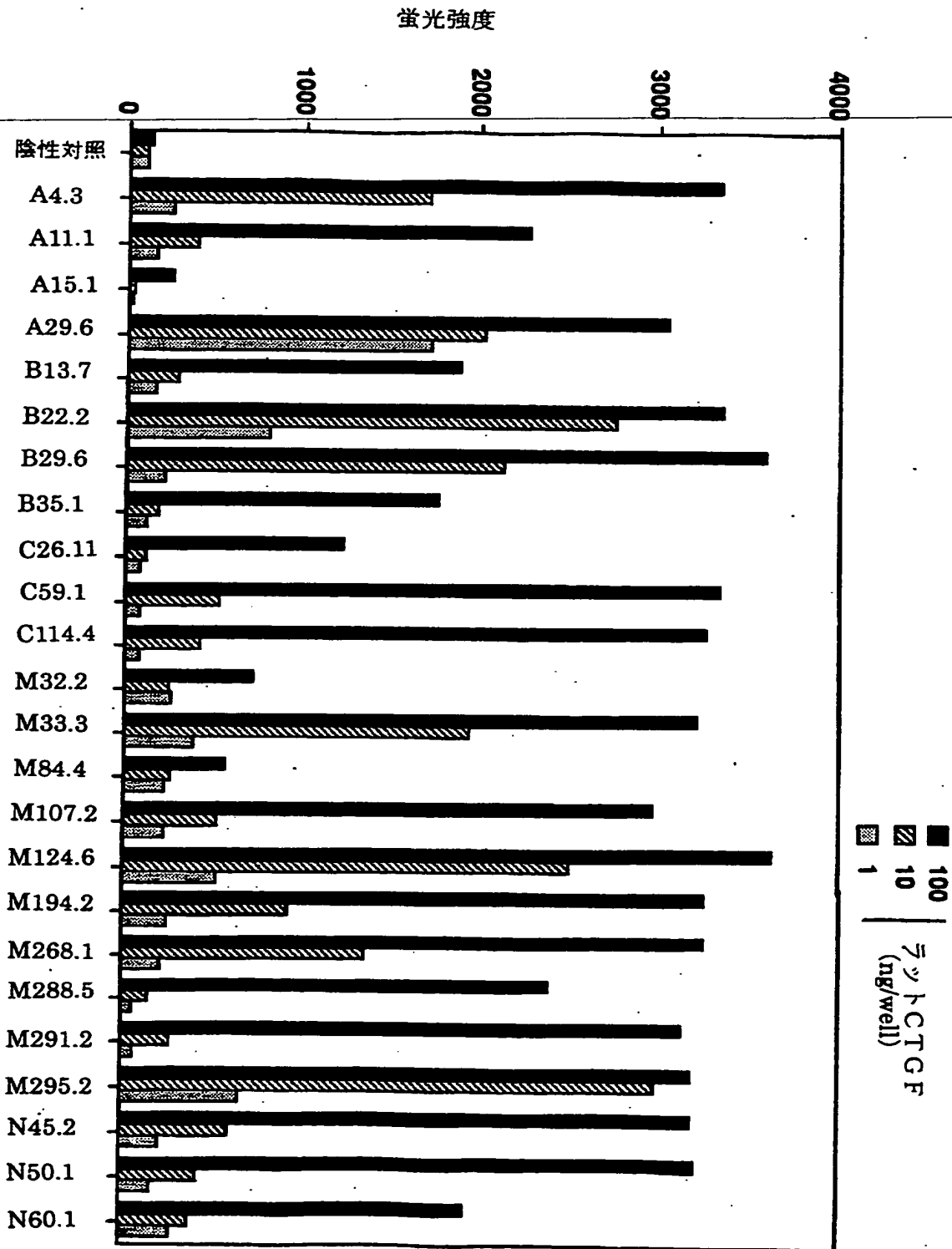
【図 8】



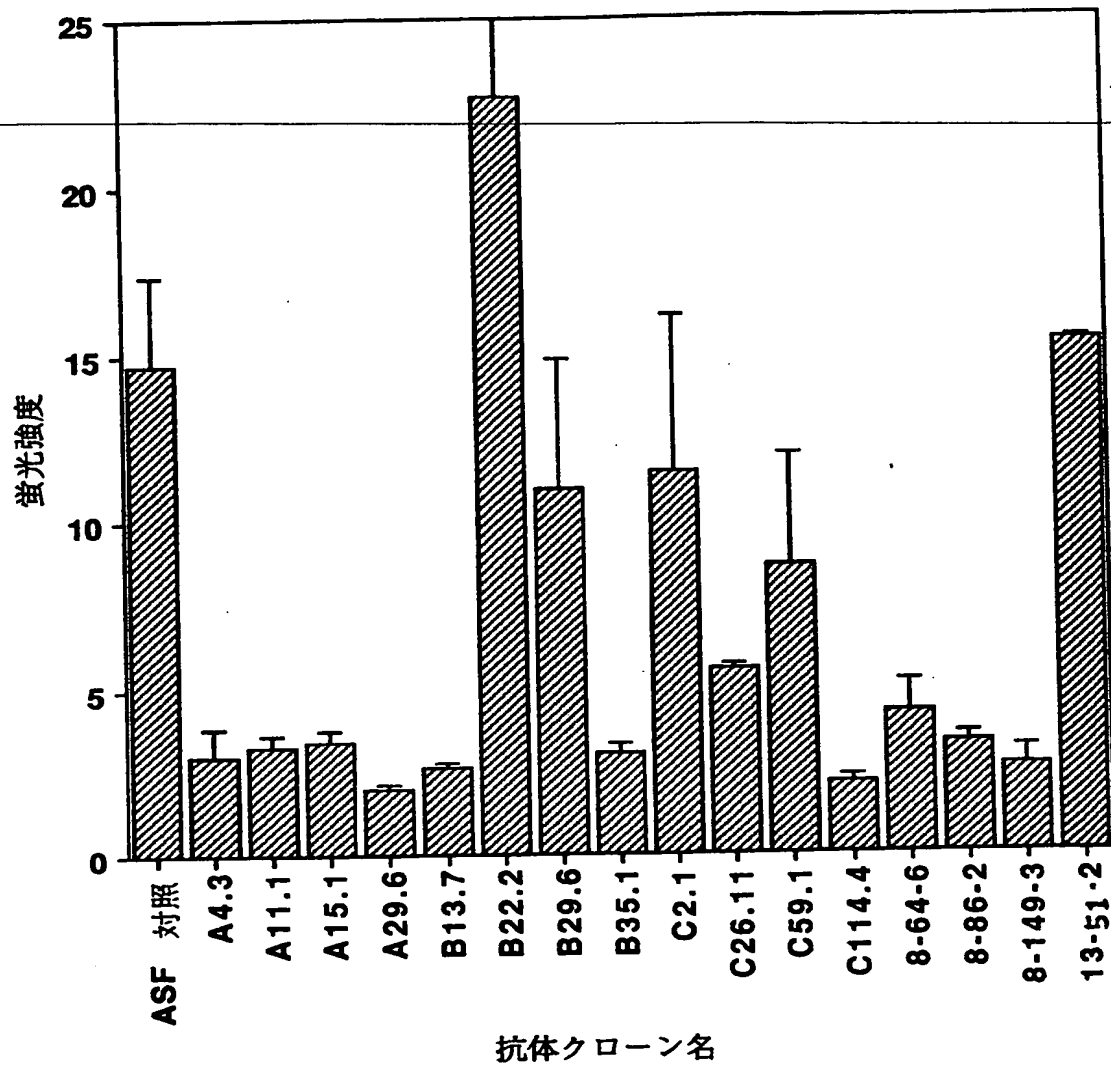
【図 9】



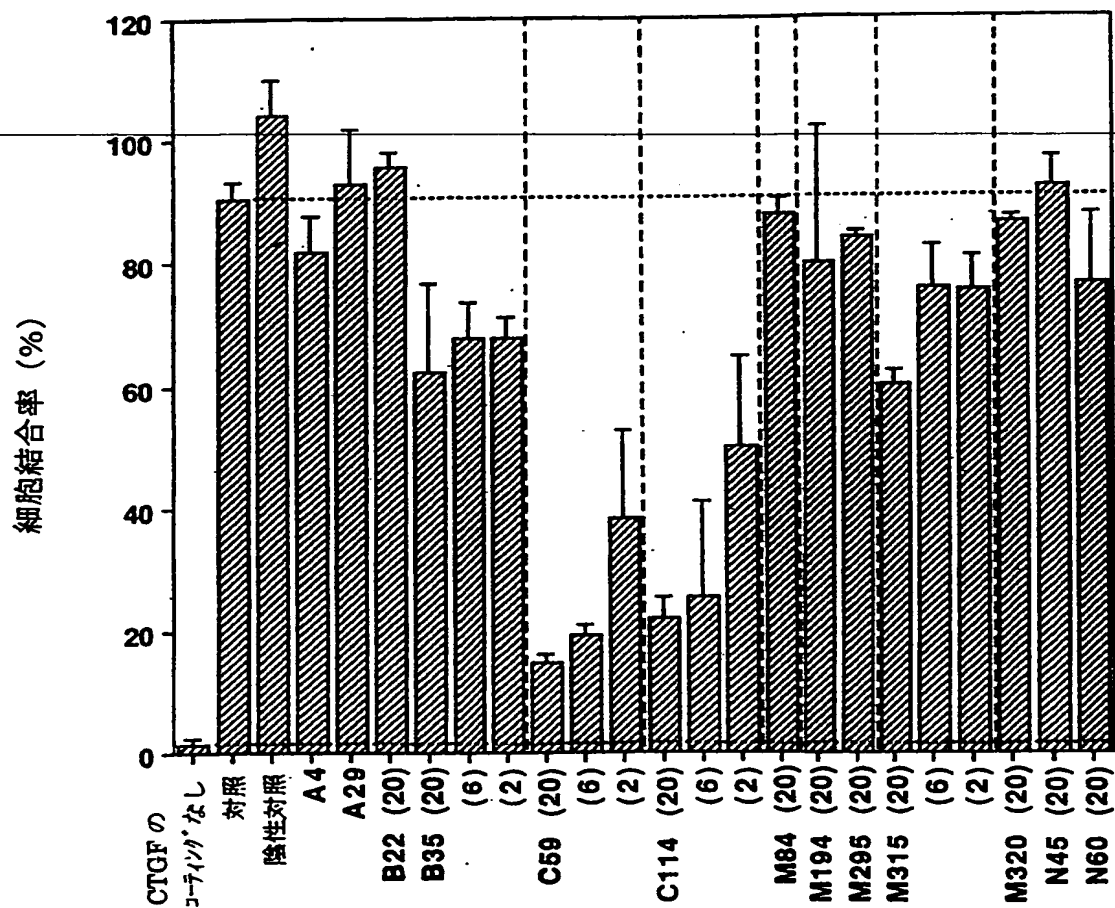
【図 10】



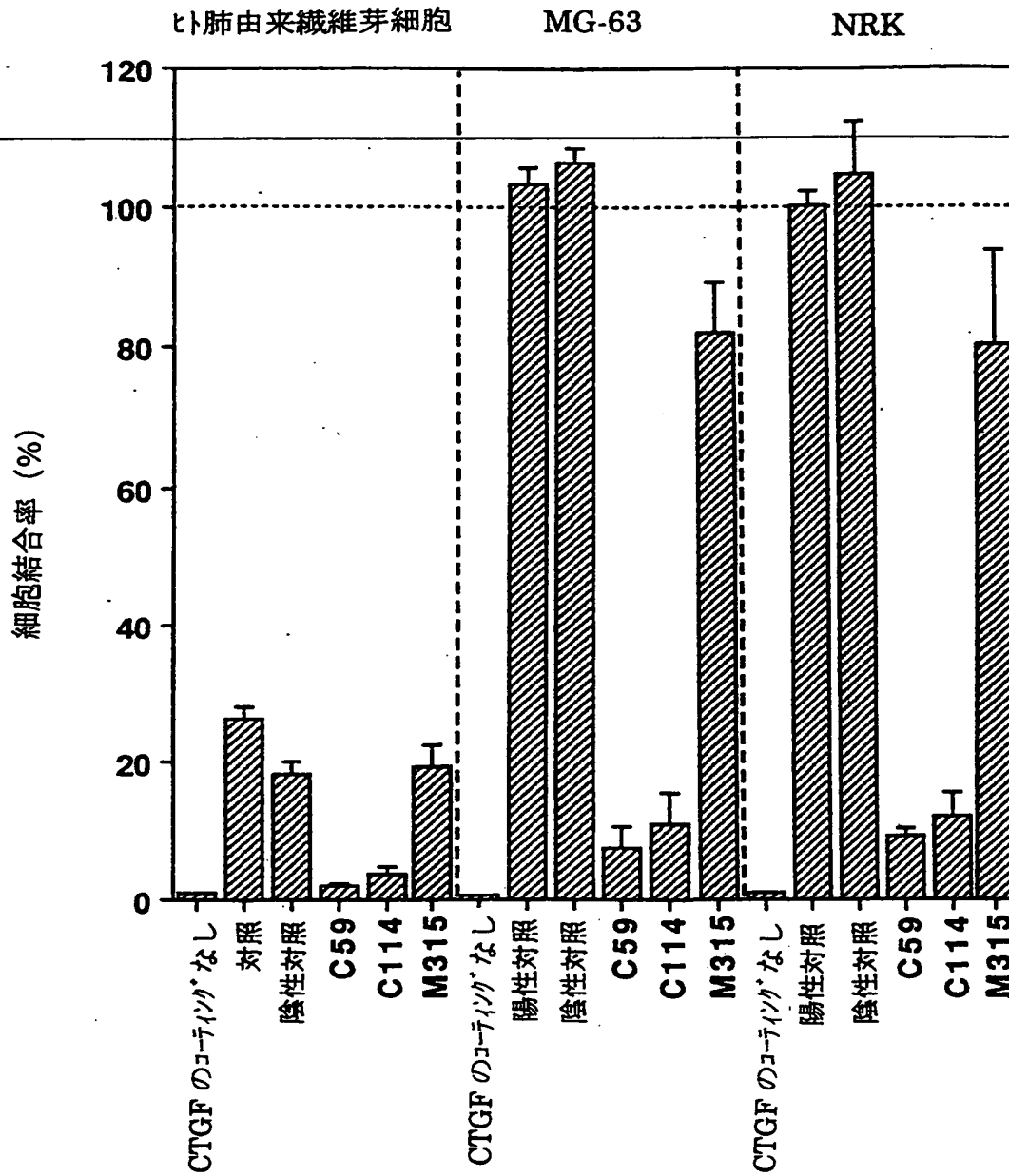
【図 11】



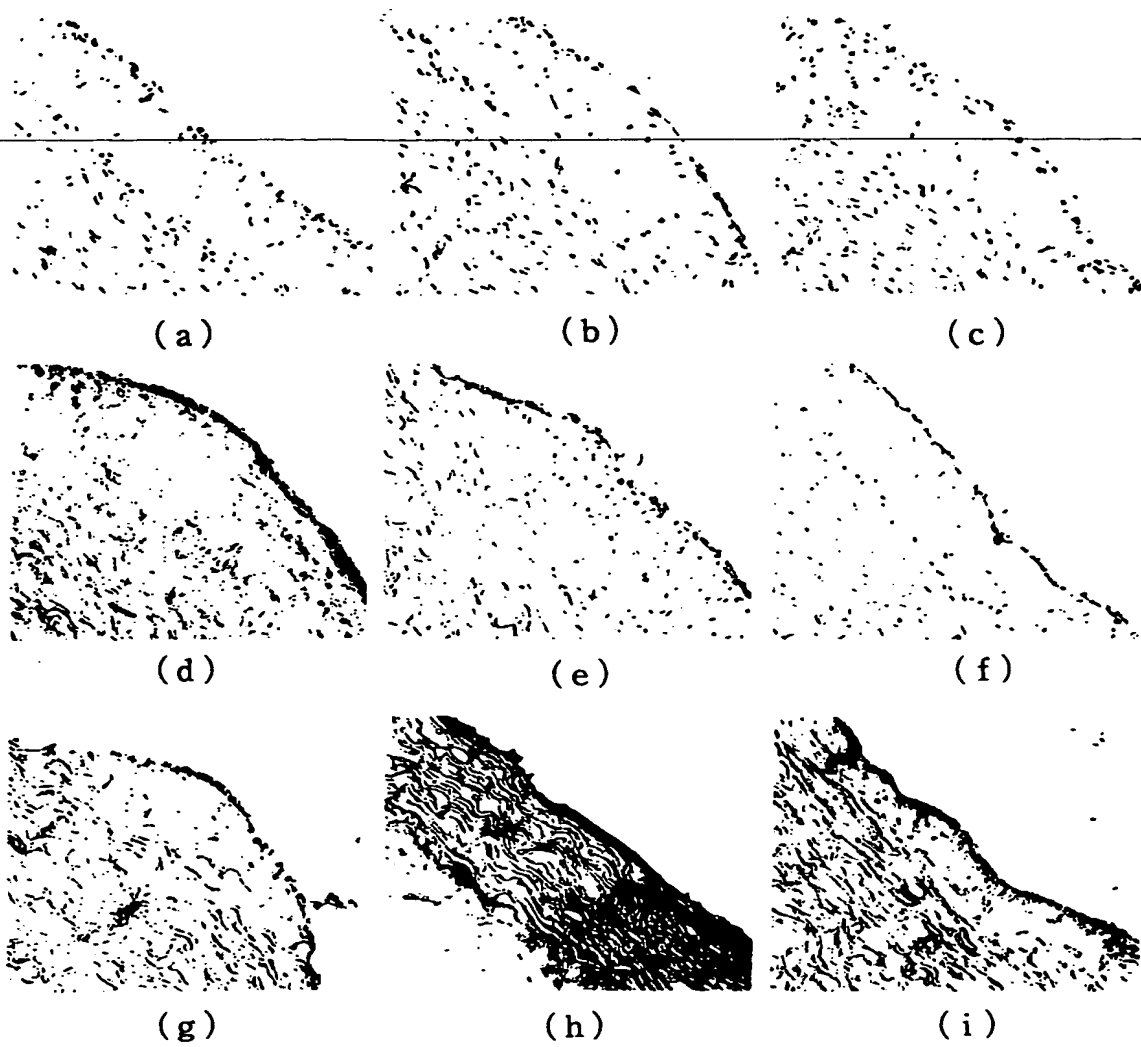
【図 12】



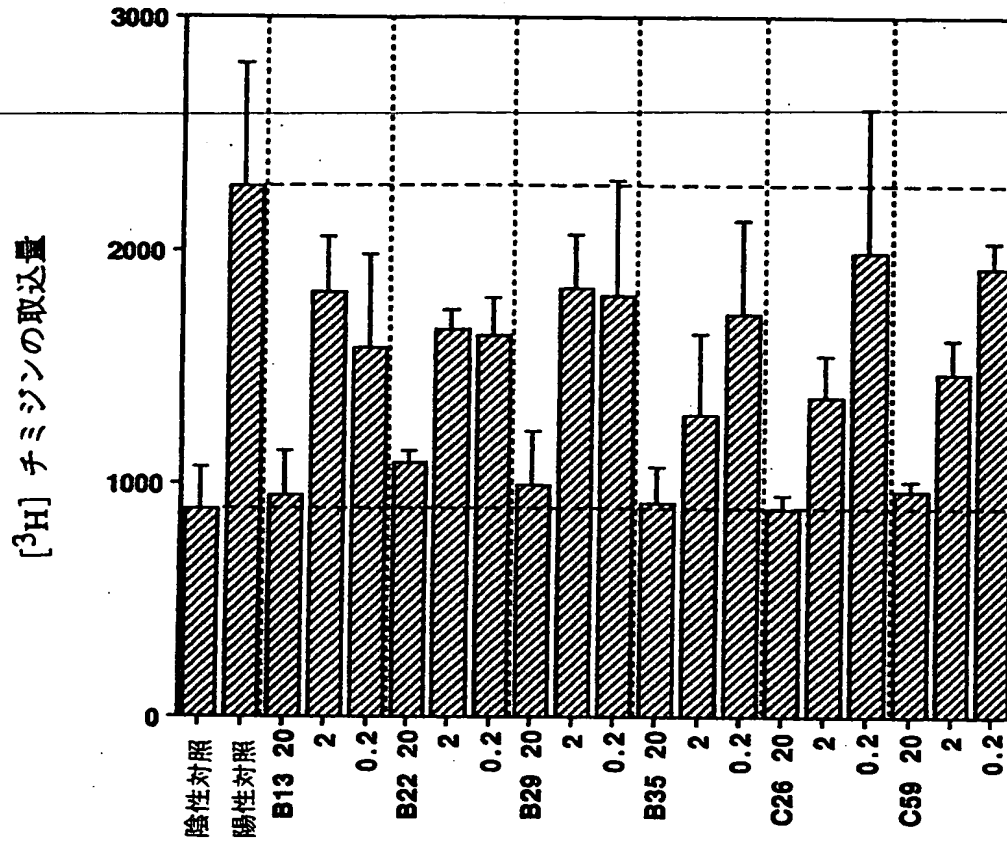
【図 13】



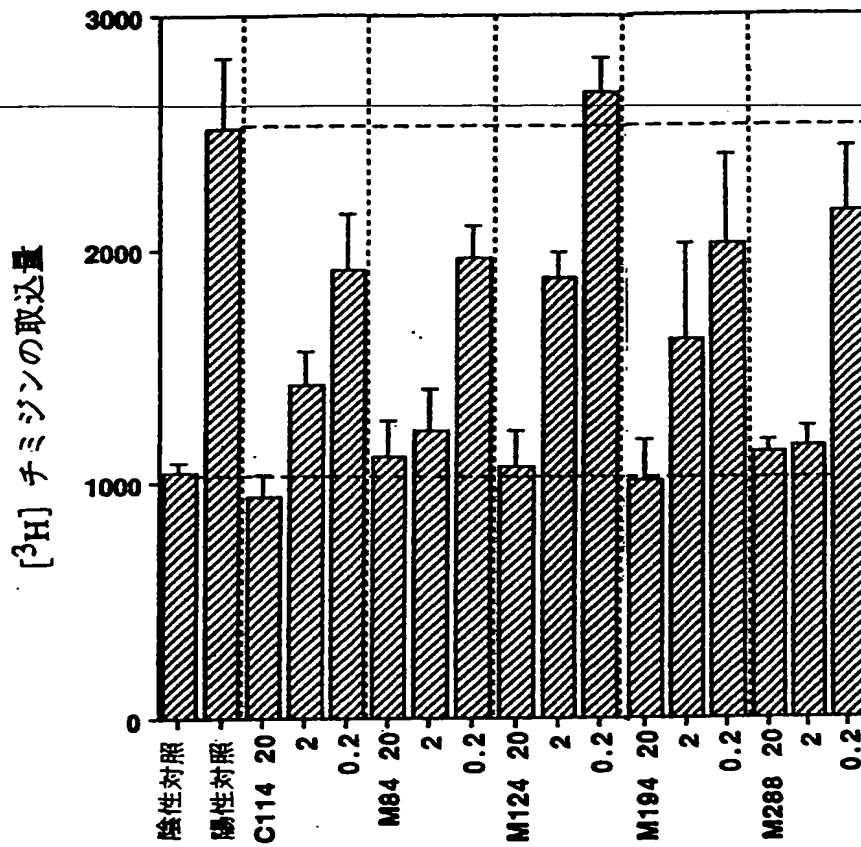
【図 14】



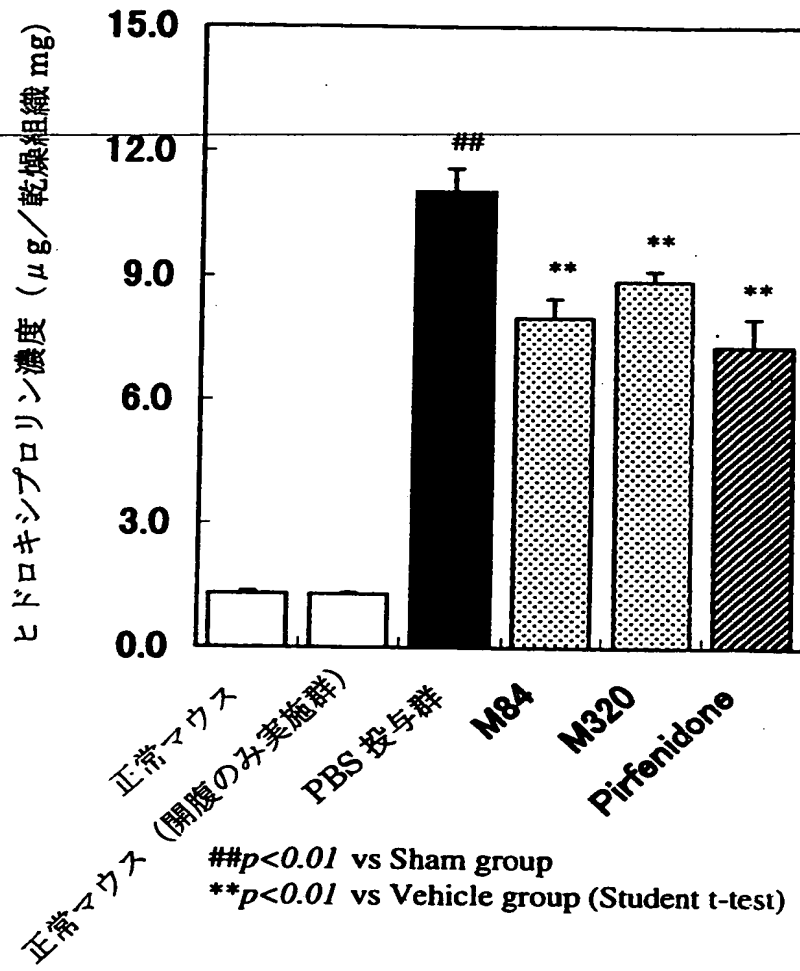
【図 15】



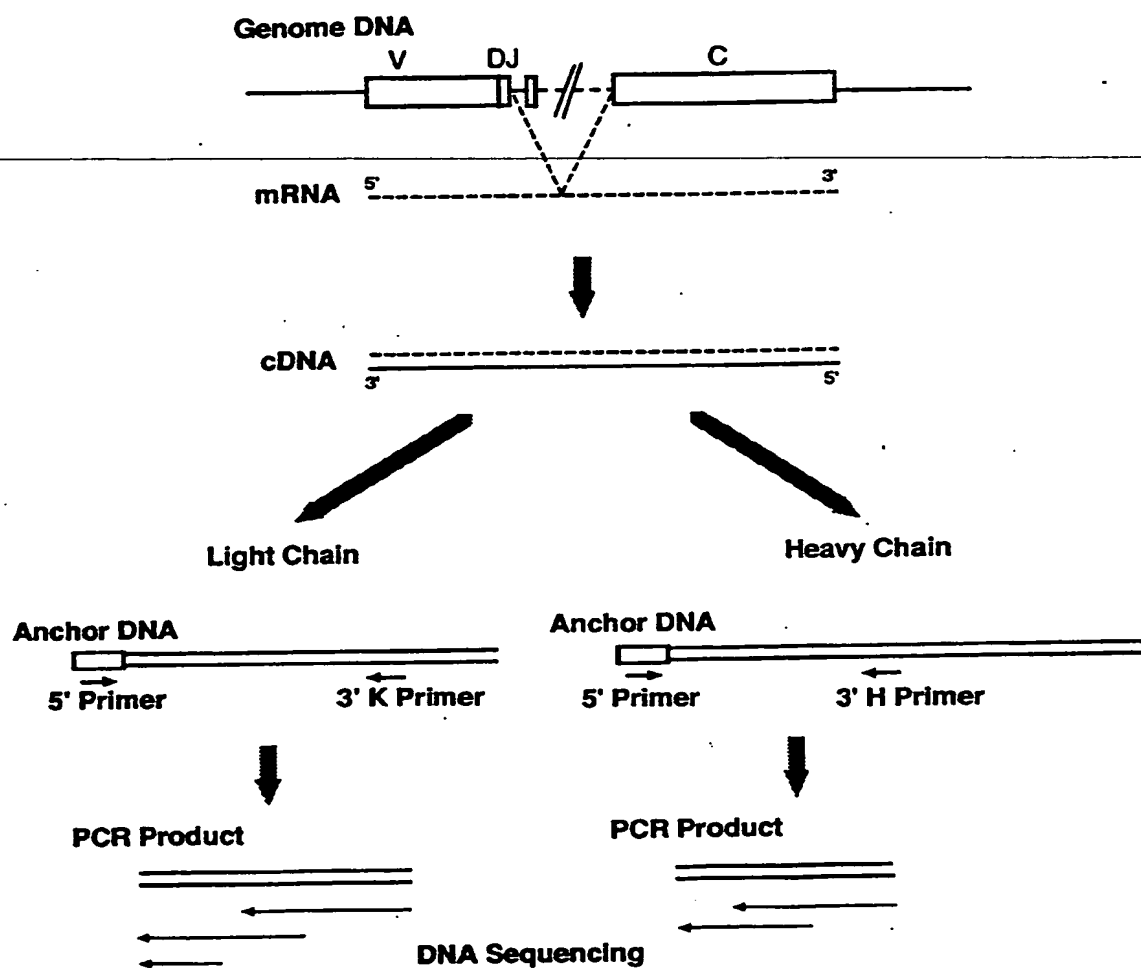
【図 16】



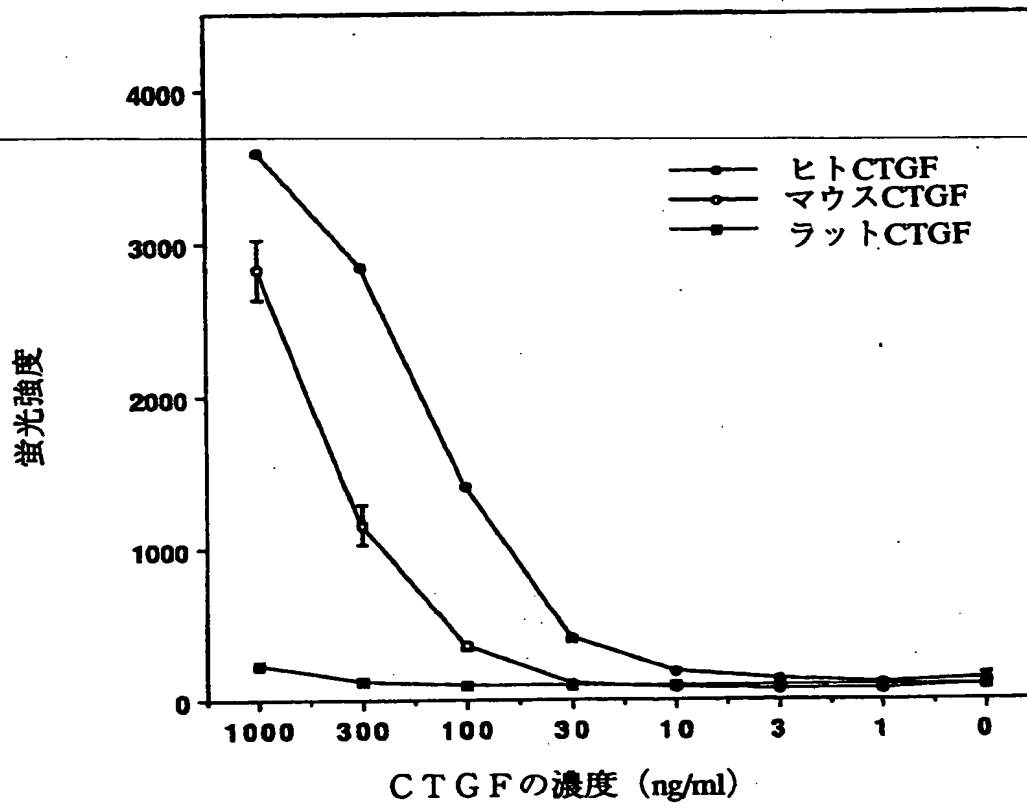
【図 17】



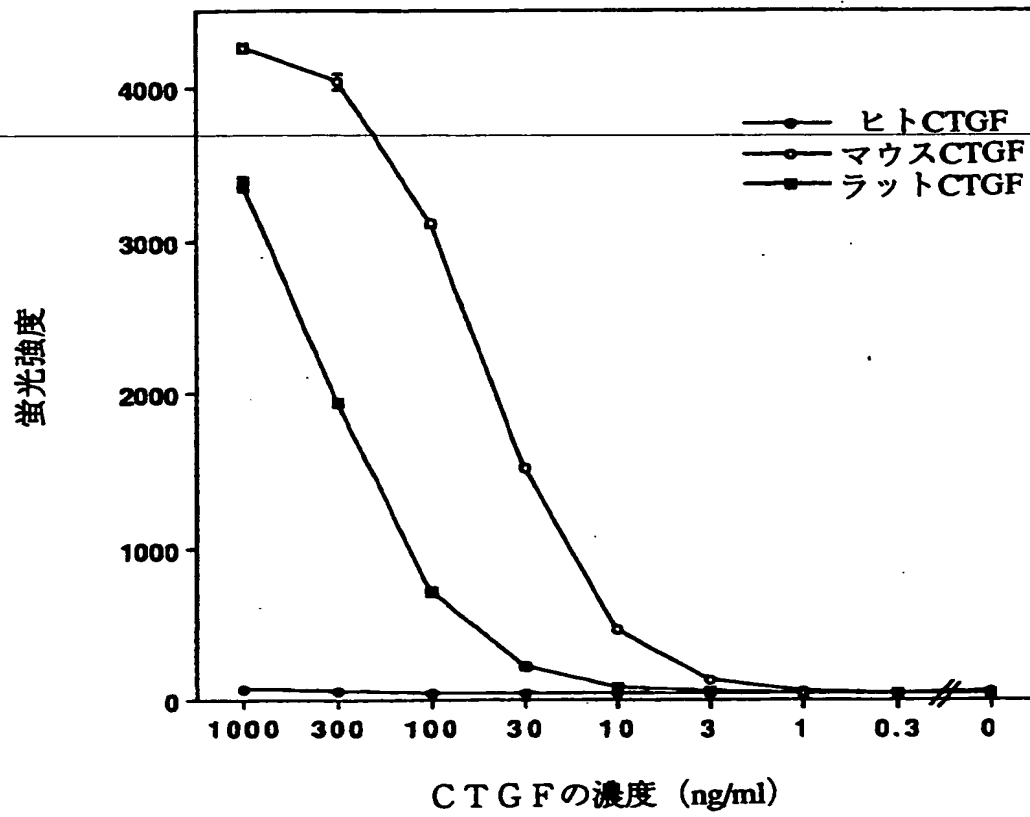
【图 18】



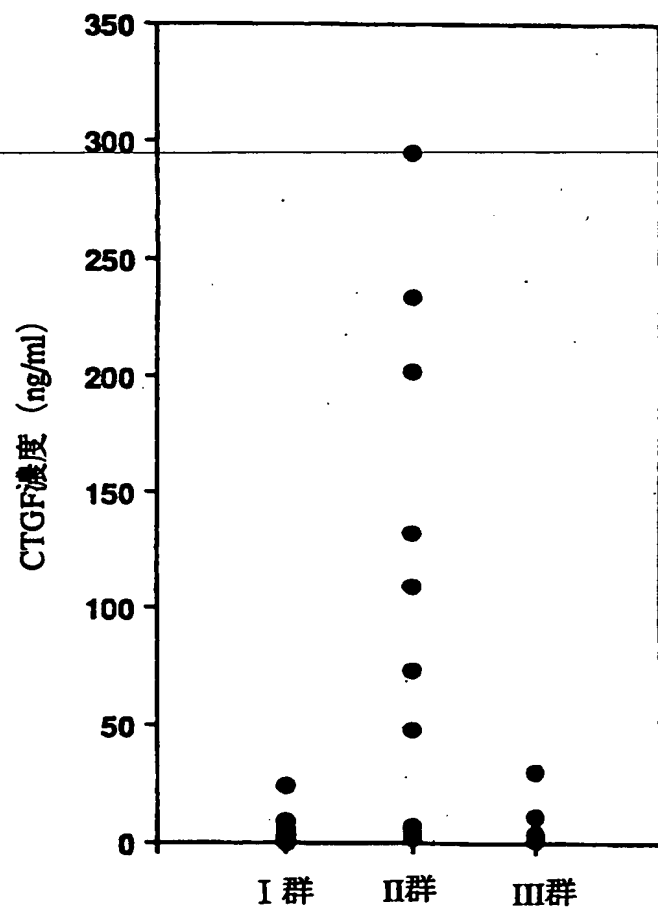
【図19】



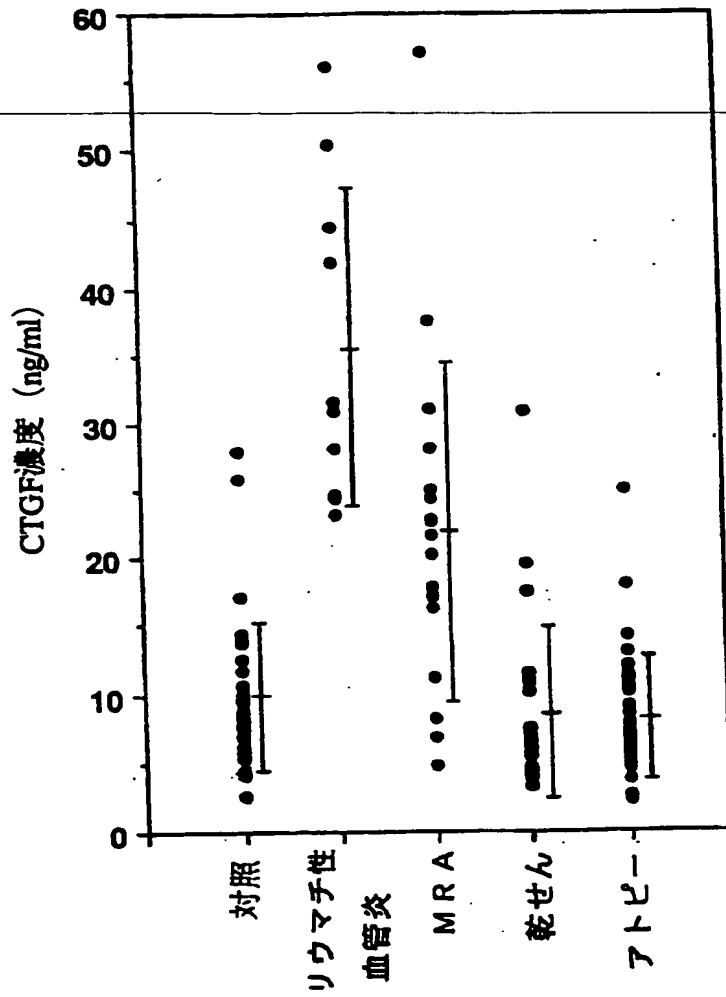
【図20】



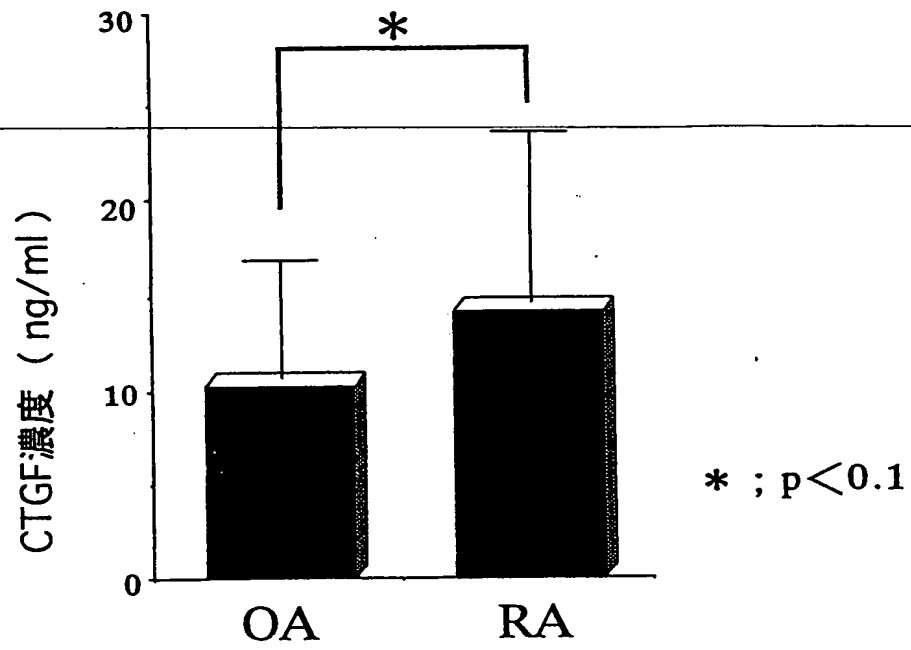
【図 2 1】



【図 2 2】



【図 23】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ヒト結合組織増殖因子（CTGF）に起因する種々の疾患の治療及び該疾患の発症の予防に有用なヒトモノクローナル抗体並びにその医薬用途を提供する。さらには、該疾患に罹患している哺乳動物の体液中のCTGFの検出及び定量において有用な種々の哺乳動物のCTGFに対する種々の特性を有する種々のモノクローナル抗体を提供するものである。

【解決手段】 ヒト、マウス及びラットに由来する各々の組換えCTGFを、マウス、ラットまたはヒト抗体産生トランスジェニックマウスに免疫することにより、抗原特異性、抗原親和性、中和活性及び交叉反応性等の性質の点で、異なる特性を有する該各々のCTGFに対する種々のモノクローナル抗体を調製した。とりわけ、ヒトCTGFに対するヒト抗体は、免疫拒絶反応等の副作用を惹起することのない抗体医薬品として極めて有用である。また、本発明の種々のモノクローナル抗体を用いた種々のイムノアッセイにより、種々の哺乳動物の体液中のCTGFを簡便かつ高感度で定量することが可能である。

【選択図】 なし

【書類名】
【訂正書類】

職権訂正データ
特許願

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成10年12月15日

【特許出願人】

【識別番号】 000004569

【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門二丁目2番1号

【氏名又は名称】 日本たばこ産業株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100100217

【住所又は居所】 大阪府高槻市紫町1番1号 日本たばこ産業株式会
社 医薬総合研究所

【氏名又は名称】 大東 輝雄

特平10-356183

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000004569]

1. 変更年月日	1995年 5月16日
[変更理由]	住所変更
住 所	東京都港区虎ノ門二丁目2番1号
氏 名	日本たばこ産業株式会社